

Eduardo Alves dos Santos

Papel do IP₃ na transdução de sinal e função da heme
oxigenase em *Plasmodium falciparum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências

Área de Concentração: Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profª. Dra. Célia Regina da Silva
Garcia

Versão corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB
quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

RESUMO

Santos EA. Papel do IP₃ na transdução de sinal e função da heme oxigenase em *Plasmodium falciparum*. [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Plasmodium falciparum, agente etiológico da malária, possui um ciclo de vida que envolve dois hospedeiros (fêmea do mosquito *Anopheles* e humanos) onde apresenta refinadas estratégias que envolvem mudanças morfológicas e bioquímicas em diferentes ambientes para garantir a sua sobrevivência. O estudo da maquinaria de sinalização deste parasita tem revelado a geração de segundos mensageiros e proteínas efetoras da sinalização celular importantes na percepção de estímulos extracelulares no parasita. Esta tese tem como finalidade demonstrar que o *P. falciparum* dentro do eritrócito é capaz de usar a via de sinalização celular dependente do segundo mensageiro inositol trifosfato (IP₃). Para isto usamos um IP₃ permeável a membrana celular denominado (caged-IP₃) que é liberado para atuar como segundo mensageiro na presença de luz ultravioleta. Investigamos os estoques de Ca²⁺ intracelular sensíveis ao IP₃ neste parasita e exploramos a sensibilidade ao IP₃ em diferentes estágios no ciclo intraeritrocítico. Demonstramos que o hormônio melatonina, importante na manutenção da sincronicidade da fase intraeritrocítica de *P. falciparum*, é capaz de aumentar a concentração de IP₃ neste parasita. Com o uso de uma coluna de afinidade ao IP₃ tentamos encontrar proteínas candidatas ao receptor de IP₃ em *P. falciparum*. Este trabalho também estuda a enzima heme oxigenase de *P. falciparum* (PfHO). Testamos a capacidade desta enzima em converter biliverdina (BV) em bilirubina (BR), uma importante reação do catabolismo da hemina. Estudamos a modulação desta atividade na presença de diversas metaloprotoporfirinas e o potencial destes compostos como antimaláricos. Reportamos que a biliverdina é capaz de modular o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* e apresentamos a proteína enolase de *P. falciparum* como candidato ao sensor de BV neste parasita.

Palavras-chave: *Plasmodium*. IP₃. Ca²⁺. Melatonina. Receptor de IP₃. Heme oxigenase. Metaloprotoporfirinas. Biliverdina. Enolase.

ABSTRACT

Santos EA. IP₃ role in signal transduction and function of heme oxygenase in *Plasmodium falciparum*. [Ph. D. thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Plasmodium falciparum, the etiological agent of malaria, possesses a life cycle that involves two hosts (the female of *Anopheles* mosquito and human) on which has refined strategies involving morphological and biochemical changes in different environments to ensure its survival. The study of the signaling machinery of the parasite has revealed the generation of second messengers and effector of cell signaling proteins important in the perception of extracellular stimuli in the parasite. This thesis aims to demonstrate that *P. falciparum* within the erythrocyte is able to use the cellular signaling pathway dependent on second messenger inositol triphosphate (IP₃). For this purpose, we use a cell membrane-permeable IP₃ called (caged-IP₃) which is released to act as a second messenger in the presence of ultraviolet light. We investigated the intracellular Ca²⁺ stores sensitive to IP₃ and explore the parasite sensitivity to IP₃ at different stages in the intraerythrocytic cycle. We demonstrate that melatonin hormone, important in maintenance synchronicity at intraerythrocytic phase of *P. falciparum*, is capable of increasing the IP₃ concentration on this parasite. Using an IP₃ affinity column, we tried to find candidate proteins for IP₃ receptor in *P. falciparum*. This work also studies the enzyme *P. falciparum* heme oxygenase (*PfHO*). We tested the ability of this enzyme to convert biliverdin (BV) in bilirubin (BR), an important reaction of heme catabolism. We studied the modulation of this activity in the presence of various metalloprotoporphyrins and the potential of these compounds as antimalarials. We reported that biliverdin is capable of modulating the intraerythrocytic cycle of *P. falciparum* and present *P. falciparum* enolase as candidate for BV sensor on this parasite.

Keywords: *Plasmodium*. IP₃. Ca²⁺. Melatonin. IP₃ receptor. Heme oxygenase. Metalloprotoporphyrins. Biliverdin. Enolase

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

Malária, causada pelo parasita do gênero *Plasmodium*, é um dos maiores flagelos da humanidade. Esta doença responde por mais de 500 milhões de casos clínicos por ano e mais de um milhão de mortes, na maioria crianças. (Snow et al., 2005).

O parasita da malária existe há pelo menos 150 milhões de anos (Carter, Mendis, 2002) e infecta vários grupos dentro de *Vertebrata*: aves, répteis e mamíferos. Há cinco espécies de *Plasmodium* capazes de infectar humanos: *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. knowlesi*.

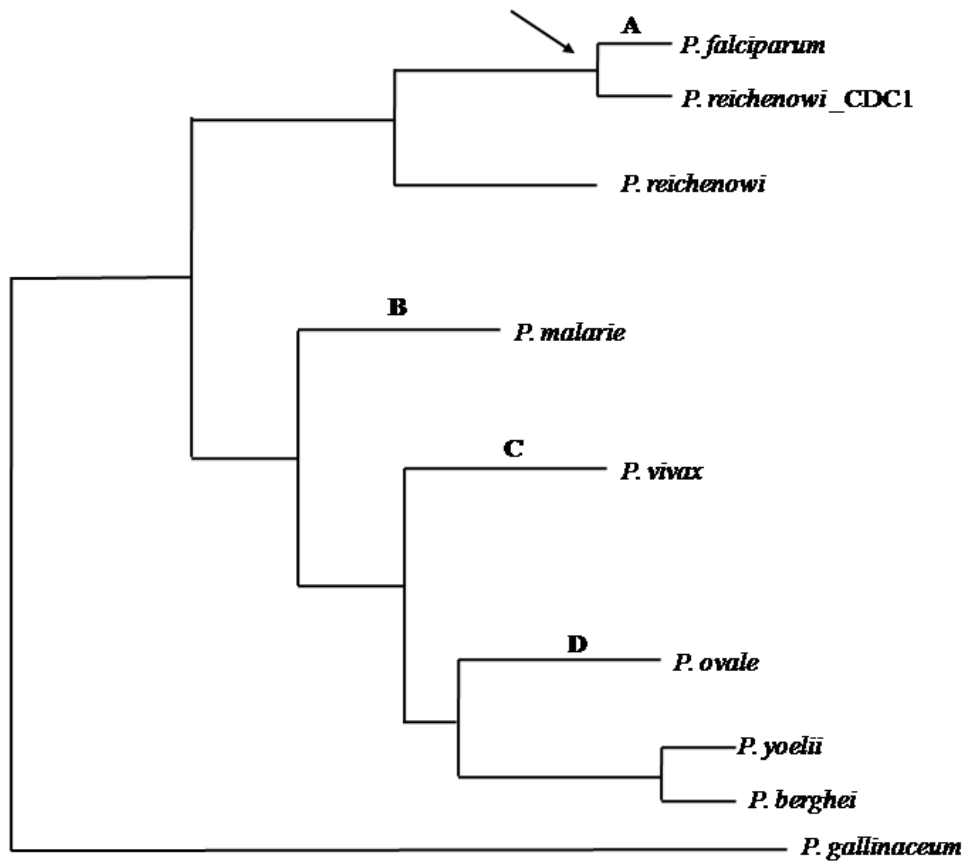
Atualmente, as espécies mais prevalentes que acometem humanos são *P. falciparum* (África sub-saariana) e *P. vivax* (Ásia, América Central e América do Sul) (Carter, Mendis, 2002), sendo *P. falciparum* a espécie que causa a forma mais letal da doença (Miller et al., 2002).

A extrema patogenicidade do *P. falciparum* sugere um recente contato com o humano, adquirido pela transferência de um hospedeiro não humano (Russel, 1950). Rich et al. (2009) mostraram que *P. falciparum* possui de fato pouco polimorfismo e corroboram com a hipótese de que *P. falciparum* originou de uma única transferência de um hospedeiro chimpanzé infectado com *P. reichenowi*, sendo que todas as cepas de *P. falciparum* estão ligadas a um braço da árvore de *P. reichenowi* (**figura 1**).

No decorrer da história, a malária tem sido um grande impedimento para o desenvolvimento humano. A doença sozinha já conseguia fazer com que projetos econômicos fossem grandemente dificultados ou até impossibilitados (Carter, Mendis, 2002). Apesar da área de ocorrência da malária ter sido confinada às regiões tropicais do globo após políticas de contenção, o número de pessoas que vivem em áreas de risco tem crescido e se encontra em torno de três bilhões, e há a expectativa de que continue crescendo (Guinovart et al., 2006). Há estudos evidenciando a relação causal existente entre malária e pobreza (Worrall et al., 2005) o que reduz o interesse no combate à doença. Além disso, a procura de tratamento especializado em países pobres é pequeno, observando-se mais o auto-tratamento (Worrall et al., 2005). Um fator agravante é o surgimento de cepas de parasitas resistentes às drogas comumente usadas. Apesar do aumento dos recursos para combate da malária para um bilhão de dólares em 2008 e o uso de várias estratégias (antimaláricos, mosquiteiros e inseticidas)

faz-se necessário um monitoramento para verificar os progressos no controle da doença e onde os esforços devem ser focados (Grabowsky, 2008).

Figura 1-Filogenia baseada no gene Citocromo B evidenciando as relações de parentescos entre quatro espécies de *Plasmodium* que acometem humanos.



A: *P. falciparum*. **B:** *P. malariae*, **C :** *P. vivax* e **D :***P. ovale* e seus grupos irmãos. *P. reichenowi* parasita chimpanzês; *P. yoelii* e *P. berghei* parasitas de roedores e *P. gallinaceum* parasitas de aves. Seta preta evidencia o ponto de origem *P. falciparum*.

Fonte: Baseado no Rich et al.(2009).

1.2 Ciclo de vida do *Plasmodium*

O desenvolvimento do parasita da malária é um processo complexo que envolve dois hospedeiros: o hospedeiro definitivo (fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles*) que são os vetores da doença na qual ocorre a fase sexuada do desenvolvimento do parasita; e o hospedeiro intermediário (havendo espécies distintas de *Plasmodium* que infectam répteis, aves e mamíferas) ocorrendo nesses vertebrados à fase assexuada do parasita.

Ao picar um hospedeiro vertebrado, mosquitos do gênero *Anopheles* injetam através da saliva dezenas de esporozoítos dando início à fase assexuada do ciclo da malária. Os esporozoítos entram na corrente sanguínea e posteriormente no fígado, alojando-se nos hepatócitos e iniciando um ciclo de reprodução assexuada. Uma característica interessante dos esporozoítos é a capacidade de fazer *traversing*. *Traversing* é passagem através de diversos hepatócitos antes da invasão da célula em que o esporozoíto sofrerá mudança de formato (*round up*) e posterior desenvolvimento em merozoítos. É interessante que o processo de *traversing* acontece sem a formação de um vacúolo parasitóforo, o que contrasta com o processo de invasão do hepatócito para desenvolvimento em merozoítos (Mota et al., 2001). Na fase hepática, o *P. vivax* é capaz de se diferenciar em um estágio de dormência denominado hipnozoíto. Estas células podem reiniciar o desenvolvimento da fase hepática e causar sintomas clínicos da doença no hospedeiro sem o contato com o mosquito (Krotoski, 1985).

Após a fase hepática, milhares de merozoítos são liberados na corrente sanguínea dando início a invasão dos eritrócitos e ao ciclo intraeritrocítico, com estágios de maturação bem definidos: anel (A), trofozoíto (T) e esquizonte (E).

Após a ruptura da célula hospedeira, os merozoítos que são liberados na corrente sanguínea invadem os eritrócitos e recomeçam um novo ciclo. Alternativamente, há a diferenciação de alguns merozoítos que invadiram os eritrócitos em gametócitos femininos e masculinos, que formam gametas quando ingeridos pelo inseto, dando início a fase sexuada. A fecundação destes gametas dá origem a um oocineto móvel, que se aloja no intestino médio do inseto e sofre divisões reducionais formando esporozoítos. Os esporozoítos migram para as glândulas salivares do mosquito onde serão liberados durante a alimentação do mosquito (Bannister et al., 2003) (**figura 2**).

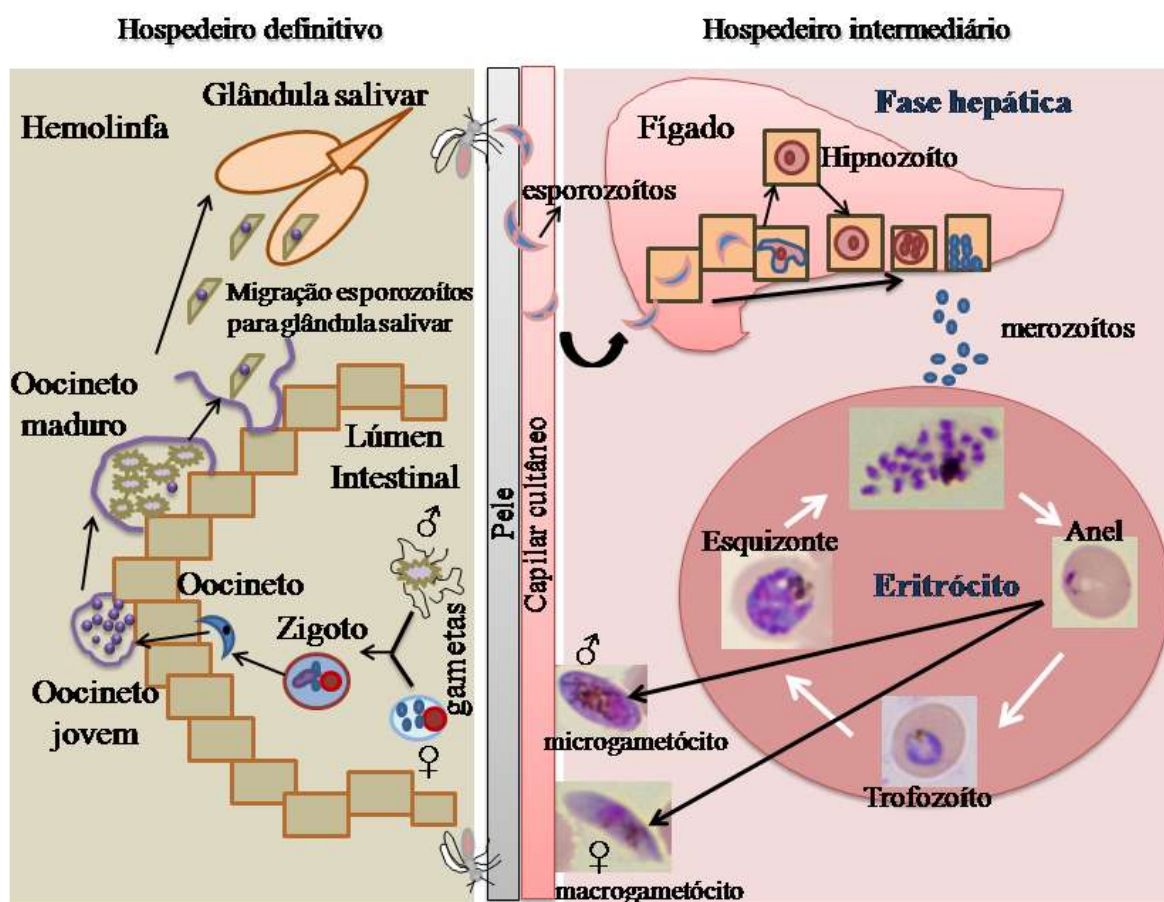
Aspectos interessantes do ciclo de vida do *Plasmodium* têm revelado estratégias que garantem o sucesso no desenvolvimento. Amino et al. (2006), acompanhando ao vivo e *in vivo* esporozoítos expressando GFP (Green fluorescence protein) revelaram a capacidade de

algum esporozoítos adentrarem os vasos linfáticos do hospedeiro intermediário. Sturn et al. (2006) demonstraram que durante o rompimento do hepatócito os merozoítos hepático são revestidos pela membrana do hepatócito (merossomo), esta estratégia evita o reconhecimento dos merozoítos pelas células de Kupffer que patrulham os sinusóides hepáticos. Durante o desenvolvimento intraeritrocítico, os eritrócitos infectados com *P. falciparum* apresentam citoaderência nas células endoteliais, este mecanismo é regulado por um conjunto de genes (var genes) que expressam proteínas PfEMP (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein) (revisado de Rowe et al., 2009). A aderência no endotélio é um mecanismo importante para evitar que eritrócitos infectados passem pelo baço, órgão capaz de remover eritrócitos envelhecidos do sistema. Mais recentemente, Riglar et al. (2013) usando técnica de microscopia tridimensional demonstraram a participação dinâmica de proteínas translocadoras no vacúolo parasitóforo no processo de exportação de proteínas, inclusive a PfEMP, em *P. falciparum*.

No mosquito, Rupp et al.(2011) reportaram que durante a ativação dos gametócitos há formação de filamentos no citossol do parasita contendo uma isoforma da actina 2, estes filamentos formam uma estrutura tubular que permite uma comunicação célula-célula nos estágios sexual do parasita dentro do sistema digestivo do inseto. Mais recentemente, Riglar et al. (2013) usando técnica de microscopia tridimensional demonstraram a participação dinâmica de proteínas translocadoras no vacúolo parasitóforo no processo de exportação de proteínas, inclusive a PfEMP, em *P. falciparum*.

A fase intraeritrocítica do *P. falciparum*, que ocorre em um período de 48 horas, é a principal causa de morbidade e mortalidade para o hospedeiro, sendo esta fase um dos principais alvos farmacológicos no combate desta doença.

Figura 2-Ciclo de vida do *Plasmodium* evidenciando os eventos que ocorrem no hospedeiro invertebrado e vertebrado.



Fonte: Baseado em Kappe et al.(2010).

1.2.1 Desenvolvimento sincrônico da fase intraeritrocítica em *Plasmodium*

Na maioria das espécies de malária que infectam mamíferos a transição entre os estágios intraeritrocítico tal como as invasões de novos eritrócitos são eventos altamente sincronizados (Doerig et al.,1997). A periodicidade das febres, causada pela lise simultânea dos eritrócitos, é a característica mais marcante da infecção que geralmente ocorre em um padrão múltiplo de 24 horas. A aparente simultaneidade de bilhões de indivíduos do parasita na corrente sanguínea pode representar uma importante e eficiente estratégia evolutiva para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro. O'Donnell et al. (2011) corroboraram com esta hipótese ao reportar que a alteração do desenvolvimento sincrônico de *P. chabaudi* causada pela perturbação do ciclo claro/escuro do seu hospedeiro camundongo causa uma diminuição de até 50% na invasão dos eritrócitos.

A sincronia apresentada em várias espécies do gênero *Plasmodium* é rapidamente perdida em cultura indicando um possível envolvimento de um sinal derivado do hospedeiro (Trader, 1976). Hawking (1970) foi o primeiro a notar a semelhança entre o ciclo da malária e um ritmo circadiano. Boyd (1929), trabalhando com um parasita de aves, reportou que quando o hospedeiro era exposto a um ritmo invertido de claro/escuro o ciclo do parasita também era invertido. Fenômeno similar foi observado em *P. brazilianum* (infecta macacos), a alteração do ciclo circadiano do hospedeiro altera o ciclo intraeritrocítico deste parasita (Taliaferro, 1934). Arnold et al. (1969) concluíram que a retirada da glândula pineal do hospedeiro gera uma dessincronização do ciclo do parasita *P. berghei*. Esses experimentos demonstraram que a sincronia do ciclo do parasita está intimamente relacionada ao ritmo circadiano do hospedeiro. Na busca de encontrar um sinal que desencadeassem mudanças circadianas em mamíferos e que poderia ser usado pelo parasitas da malária, o hormônio melatonina surgiu como um forte candidato.

A melatonina participa na regulação do ritmo circadiano de muitos eucariontes, incluindo vertebrados, invertebrados, plantas terrestres e dinoflagelados (Cassone et al., 1997).

Hotta et al. (2000), reportaram um aumento na proporção de esquizontes em culturas de *P. falciparum* tratadas com o hormônio melatonina. Neste mesmo trabalho reportaram que parasitas *P. chabaudi* (infecta camundongos) perde sua sincronia quando seu hospedeiro é pinealectomizados (remoção da glândula pineal, local onde ocorre produção de melatonina). Entretanto a sincronia é restabelecida com a aplicação de melatonina exógena. Este efeito é abolido quando a melatonina é aplicada na presença do luzindole, uma antagonista que se liga ao receptor de melatonina.

N-acetilserotonina, triptamina, serotonina (moléculas precursores da melatonina) e N(1)-acetil-N(2)-formil-5-metoxicimuramina (AFMK, produto de degradação da melatonina) também são capazes de modular o ciclo intraeritrocítico do *P. falciparum* (Beraldo et al., 2005; Budu et al., 2007).

Interessante que, *in vitro*, melatonina não é capaz de modular o ciclo celular de *P. berghei* e *P. yoelii*, dois parasitas de roedores que mostram um desenvolvimento desincronizado *in vivo* (Bagnaresi et al., 2009).

1.3 Sinalização celular em *Plasmodium*

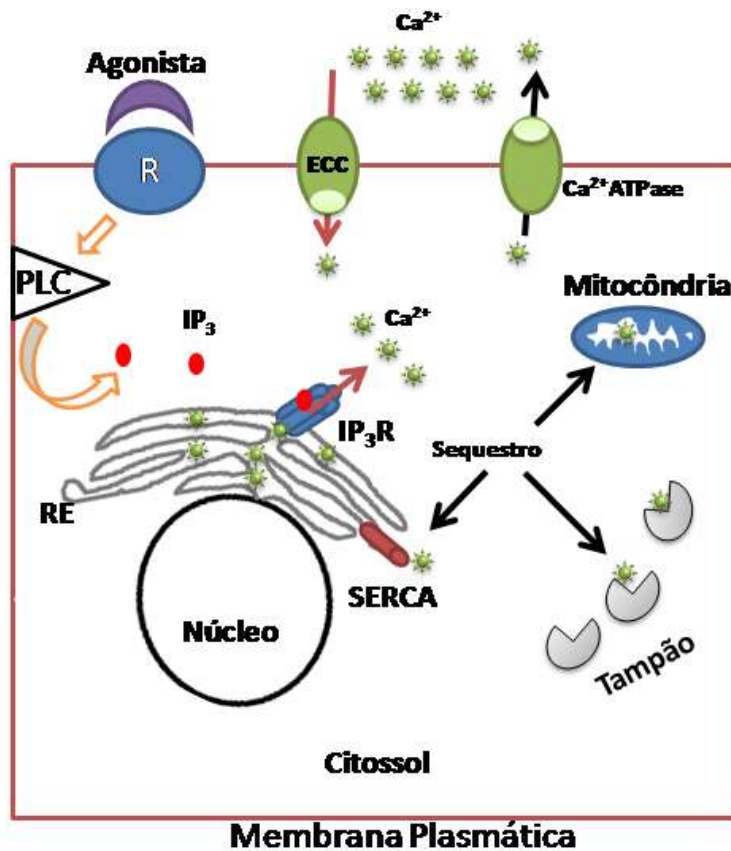
Para completar com sucesso o ciclo de vida, o parasita precisa perceber e se adaptar a diferentes ambientes que incluem regiões intra e extracelulares em hospedeiros filogeneticamente muito distantes (Bannister, Mitchell, 2003). A percepção do ambiente é um fato fundamental para sobrevivência do parasita que conta com mecanismos de sinalização intracelular que ativam e modulam diversos processos que preparam o parasita a enfrentar eficientemente as diferentes fases de desenvolvimento em seu ciclo.

1.3.1 Maquinaria de sinalização via Ca^{2+}

O Ca^{2+} é um sinalizador intracelular muito versátil capaz de regular diversas funções celulares diferentes (Berridge et al., 2003). Ele é capaz de agir em milissegundos na exocitose de vesículas sinápticas ou ao longo de horas, no caso da regulação da expressão gênica. Cada tipo de célula expressa componentes da sinalização de Ca^{2+} distintos, gerando sistemas distintos de sinalização (Berridge, 2003). Esses sistemas funcionam através da criação de breves pulsos de Ca^{2+} na célula, pelo controle do aumento e diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular (**figura 3**).

Assim como qualquer célula eucariótica, o parasita da malária mantém uma baixa concentração citoplasmática de Ca^{2+} (Garcia, 1999) e pequenas variações deste íon são capazes de modular importantes processos como a invasão dos merozoítos nas células vermelhas (Lew, Tiffert, 2007).

Figura 3-A sinalização por Ca^{2+} e sua homeostase.



O estímulo (agonista) se liga receptor (R) na membrana ativando uma fosfolipase C (PLC) formando inositol trifosfato (IP_3) que libera Ca^{2+} de estoques intracelulares, no caso, do retículo endoplasmático. Uma grande quantidade do Ca^{2+} que entra liga-se a tampões, uma pequena quantidade liga-se a efetores que participarão efetivamente do processo de sinalização celular. O sequestro do Ca^{2+} citossólico pode consistir na expulsão do Ca^{2+} da célula através de canais uniporta, canais que trocam sódio ou através do sequestro do Ca^{2+} pelo RE pela SERCA (Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático). O Ca^{2+} também pode ser sequestrado pela mitocôndria através de uma uniporta e então ser lentamente devolvido ao citosol para ser captado pelo RE ou ser bombeada para fora por uma cálcio-ATPase da membrana plasmática. IP_3R : receptor do inositol-1,4,5-trisfosfato, R- receptor da membrana plasmática. ECC : entrada capacitativa de Ca^{2+} .
 Fonte: Baseado na revisão de Berridge (2003).

Há duas formas com a qual a célula pode mobilizar o Ca^{2+} : através da liberação de Ca^{2+} em depósitos intracelulares e o influxo de Ca^{2+} do ambiente extracelular. A mobilização de Ca^{2+} a partir de depósitos intracelulares é um mecanismo ubiqüitário e um evento essencial para a transdução de sinal ativada por hormônios e outros agonistas. Por outro lado, a homeostasia deste íon precisa acontecer para a sobrevivência da célula, pois altas concentrações citosólicas de cálcio mantidas por muito tempo provocam apoptose (revisado de Berridge, 2009).

Diversos trabalhos têm mostrado evidências da existência de dois compartimentos distintos de estoques de Ca^{2+} em *Plasmodium* (Biagini et al., 2003; Garcia et al., 1996; Varotti

et al., 2003): retículo endoplasmático, sensível à thapsigargina (thaps) que age inibindo a SERCA (Sarco Endoplasmatic Reticulum Ca^{2+} -ATPase), responsável pelo bombeamento deste íon para dentro da organela e um compartimento ácido caracterizado através do colapso do gradiente de pH intracelular e consequente mobilização de Ca^{2+} a partir do uso de ionóforos Na^+/H^+ (monensina) e K^+/H^+ (nigericina).

Na fase intraeritrocítica o parasita enfrenta um desafio para utilizar o Ca^{2+} para a sinalização, pois se encontra separado do meio externo que contém concentrações milimolar de Ca^{2+} , pela membrana do vacúolo parasitóforo, pelo citossol e pela membrana da hemácia. Gazarini et al. (2003) demonstraram que o vacúolo parasitóforo, espaço existente entre a membrana do parasita e a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) é rico em Ca^{2+} , sugerindo que durante a invasão as bombas de Ca^{2+} da membrana plasmática do eritrócito passam a fazer parte da MVP e bombeiam Ca^{2+} para o vacúolo parasitóforo. O Ca^{2+} é importante para a ativação de algumas enzimas no parasita, como a PKB (proteína quinase do tipo B), ativada por cálcio-calmodulina (Vaid, Sharma 2006; Vaid, Sharma 2008) e cisteíno-proteases (Farias et al., 2005).

Muitos componentes básicos para uma clássica sinalização dependente de Ca^{2+} já foram caracterizados em *Plasmodium* e outros Apicomplexas (filo que inclui o gênero *Plasmodium*) incluindo: quatro sequências putativas de receptores heptaélicos (Madeira et al., 2008); proteína-G, inferida pela interferência que a toxina colérica e pertúnica causam na gametogênese em *P. falciparum* além das sequências de isoenzimas similares a PLC δ em *Plasmodium* e *Toxoplasma* (Fang et al., 2006; Gardner et al., 2002). Além do mais, bombas Ca^{2+} -ATPases como SERCA e proteínas que regulam excesso de Ca^{2+} já foram identificadas (Billker et al., 2009; Dvorin et al., 2010; Koyama et al., 2009; Nagamune et al., 2006; Vaid et al., 2006; Vaid et al., 2008). Estes trabalhos indicam a clara importância que a regulação e a homeostase de Ca^{2+} neste grupo.

Entretanto, após mais de uma década do sequenciamento do genoma do *P. falciparum*, componentes importantes na sinalização dependente de Ca^{2+} ainda não foram identificados, dentre eles, destacam-se a proteína-G e o receptor de IP_3 .

1.3.2 Via de sinalização induzida pela melatonina em *Plasmodium*

A melatonina é um composto lipofílico e, portanto, pode-se difundir livremente através de membranas biológicas e bem como na barreira hematoencefálica. Nos animais, a via biossintética utiliza serotonina como precursor, possuindo dois passos que envolvem: N-acetilação (formando o N-acetil-serotonina) e O-metilação (formando a melatonina). A enzima N-acetil-transferase é produzida constitutivamente na glândula pineal, porém, devido à ação inibitória da luz, à noite sua produção aumenta 20 a 100 vezes (Reiter, 1991; Vanecek, 1998). Este fato implica que o parasita *Plasmodium* recebe um pico deste hormônio durante o ciclo escuro do hospedeiro.

Hotta et al. (2000), ao explorarem as vias de sinalização ativada pela melatonina em *P. chabaudi* e *P. falciparum*, reportaram que este hormônio induz a liberação de Ca^{2+} citossólico tanto na presença quanto na ausência de Ca^{2+} extracelular, sugerindo a participação de Ca^{2+} nos compartimentos intracelulares. Porém, a mobilização de Ca^{2+} é abolida na presença da droga U73122 (um inibidor de fosfolipase C) e luzindol (um antagonista dos receptores de melatonina). Este trabalho é uma evidência de que a melatonina atua por uma via de sinalização dependente do IP_3 em *Plasmodium*. A mobilização de Ca^{2+} induzida pela melatonina não é observada em *P. berghei* e *P. yoelii* (espécies cujo ciclo não é modulado pela melatonina) (Bagnaresi et al., 2009).

Beraldo et al. (2005) reportaram a interação da via de sinalização de entre os segundos mensageiros Ca^{2+} e AMP_c . Neste trabalho, foi demonstrado que em *P. falciparum* a melatonina aumenta os níveis de AMP_c , efeito bloqueado com a adição do U73122 (inibidor da PLC) e por um quelante intracelular de cálcio (BAPTA). A adição de 6-BZ-cAMP (análogo permeável do AMP_c), um ativador clássico da proteína PKA (fosfo quinase A), aumenta as concentrações de Ca^{2+} citossólico que culmina na modulação do ciclo. O bloqueio da PKA abole o efeito na modulação do ciclo induzida pela melatonina. A PKA, também conhecida como proteína quinase dependente de AMP_c , é um importante mediador na fosforilação de proteínas e está envolvida na regulação de canais de ânions e na invasão de eritrócitos em *Plasmodium* (Leykauf et al., 2010, Merckx et al., 2008). Em adição, Fariaset al. (2005) reportaram que uma cisteína protease também é ativada por cálcio e melatonina.

Levano-Garcia et al. (2010) demonstraram que a mobilização de Ca^{2+} induzida pela melatonina em eritrócitos infectados com *P. falciparum* nos estágios trofozoíto (T) e esquizontes (E) é sustentada na presença de nucleotídeos ATP e UTP. Esta mobilização de

Ca^{2+} é abolida quando se remove o Ca^{2+} extracelular, sugerindo a participação de um receptor de ATP que atua como canal de Ca^{2+} .

Koyama et al. (2012) investigaram a participação de uma proteína quinase (PfPK7) na sinalização mediada pela melatonina em *P. falciparum*. Neste trabalho, foi demonstrado que *P. falciparum* nocautes para o gene PfPk7 (PfPK7⁻) tem mobilização de Ca^{2+} induzida pela melatonina diminuída comparado com parasitas selvagens e não tem seu ciclo regulado pela melatonina, entretanto a expressão epissomal do gene PfPK7 nos parasitas PfPK7⁻ restabeleceu a capacidade destes parasitas em ter seu ciclo modulado pela melatonina. Este trabalho demonstra a importância dos eventos de fosforilação na via de transdução de sinal estimulada pela melatonina. Interessante ressaltar que a o nocaute do gene PfPK7 reduz o número de merozoítos produzidos na esquizogonia diminuindo a parasitemia na fase intraeritrocítica, além de bloquear a formação dos oocistos no trato intestinal dos mosquitos (Dorin-Semblat et al., 2005).

O sistema ubiquitina/proteossomo (UPS) é uma via de degradação de proteínas que desempenha diversos papéis no ciclo celular, regulação de transcrição e transdução de sinal em eucariotos (Hershko et al., 1998). Koyama et al. (2012) ao medirem a transcrição gênica de 14 genes que codificam componentes do UPS em *P. falciparum*, reportaram que este sistema era positivamente regulado em parasitas tratados com melatonina, este efeito era abolido quando melatonina era adicionada com luzindol. Usando a mesma técnica, Koyama et al. (2012) demonstraram que melatonina não foi capaz de regular os componentes do sistema UPS em parasitas PfPK7⁻. Este trabalho demonstra a importância dos eventos de fosforilação e a participação do UPS na transdução de sinal em *P. falciparum*.

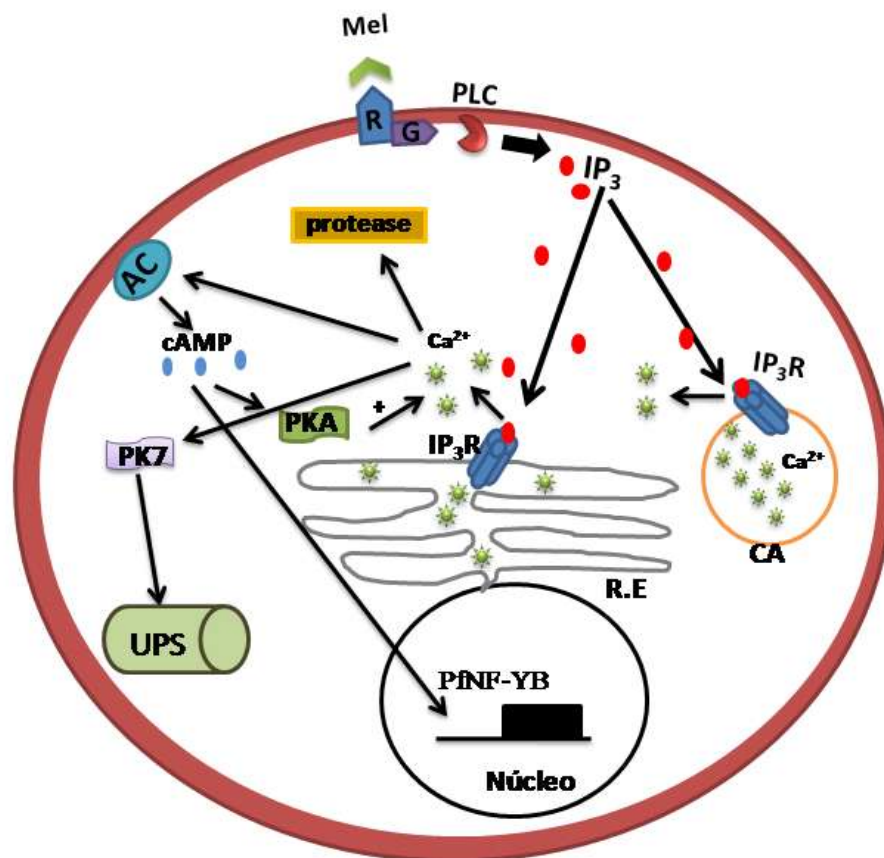
Em vertebrados, a melatonina é capaz de regular genes dependentes do fator de transcrição NF-YB (Nuclear transcription factor subunit beta), estes genes estão associados à expressão de enzimas antioxidantes e fatores inflamatórios (Tomas-Zapico et al., 2005). Lima et al. (2013) usando PCR em tempo real e western blot reportaram que melatonina e 6-BZ-AMP_c regulam o fator de transcrição *CCAAT-box DNA binding protein subunit B* (PfNF-YB, número de acesso PF11_0477) em *P. falciparum*. Este trabalho demonstrou que a ubiquitinação da PfNF-YB é estimulada pela melatonina e que o uso do bortezomide (inibidor do UPS) é capaz de regular a expressão do PfNF-YB.

Em humanos, os receptores de melatonina MT1 e MT2 estão geralmente associados à proteína G α_1 (Jockers et al., 2008) mediando as respostas celulares via inibição da AMP_c e PKA. Entretanto, os receptores de melatonina também podem se associar à proteína G que provoca a ativação da PLC e geração de IP₃ (Brydon et al., 1999; Lai et al., 2002; Steffens et

al., 2003), inclusive em melanócitos de *Xenopus* (Mullins et al., 1997) e dinoflagelados (Tsim et al., 1997). A ausência de uma proteína G indetificada no genoma de *Plasmodium* sugere que a identidade do receptor de melatonina em *P. falciparum* seja distinta do hospedeiro humano.

A sinalização induzida pela melatonina no *Plasmodium* (**Figura 4**) tem contribuído para revelar os mecanismos fisiológicos que permitem estas células regularem seu ciclo de vida além de revelar potenciais alvos no compate à malária.

Figura 4-Via de sinalização de melatonina em *Plasmodium*.



Mel: Melatonina, R: receptor, G: proteína-G, PLC: fosfolipase C, RE: retículo endoplasmático, IP₃R: receptor de IP₃, PK7: proteína quinase 7, AC: adenilato ciclase, PKA: proteína quinase A, CA: vacúolo ácido, cAMP: adenosina monofosfato cíclica, PK7: proteína quinase 7, UPS: sistema ubiquitina/proteossomo e Pfnf-YB: CCAAT-box DNA binding protein subunit B.

Fonte: Baseado nos dados de: Beraldo et al. (2005); Beraldo et al. (2007); Farias et al. (2005); Gazarini et al. (2003); Hotta et al. (2000); Passos et al. (1998); Koyama et al. (2012); Lima et al. (2013); Varotti et al. (2003).

1.4 Inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃)

1.4.1 IP₃ e metabolismo

A abolição da mobilização de Ca²⁺ induzida por melatonina pela droga U73122 (Beraldo et al., 2005) em *Plasmodium* sugere a existência de uma clássica via de sinalização baseada no mio-inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃).

IP₃ é um segundo mensageiro ubiquitário que regula a atividade do Ca²⁺ citossólico. Muitos trabalhos levaram a suspeita do IP₃ como segundo mensageiro. Hokin et al. (1953) demonstraram que a formação de fosfatidilinositol (PI) era estimulada por agonistas externos a células. Michell (1975) foi o primeiro a propor que a hidrólise dos lipídeos de membrana era capaz de mobilizar Ca²⁺, esta hipótese foi validada pelo Berridge et al. (1979) ao estudar mobilização de ⁴⁵Ca²⁺ em glândulas de insetos. Berridge (1983) sugeriu que o IP₃ era o fator solúvel que causava a mobilização de Ca²⁺ em compartimentos intracelulares, mas foi o trabalho de Streb et al. (1983) que demonstrou diretamente a função do IP₃ como segundo mensageiro ao estudar a mobilização de Ca²⁺ induzida por concentrações micromolares de IP₃ em células acinares pancreáticas permeabilizadas. Neste trabalho, a mobilização de Ca²⁺ era originada de compartimentos não mitocondriais.

A formação do IP₃ na célula envolve desde a captação do inositol que é inserido nos fosfolipídeos específicos na membrana. A via metabólica mais simples e a mais bem estudada em mamíferos envolve ativação da fosfolipase C beta (PLCβ) mediada por receptor na superfície da membrana plasmática acoplada a proteína G. PLCβ cliva o fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato (PIP₂) formando 1,2-diacilglicerol (DAG) e IP₃ (Woodcock, 1996). DAG ativa vários isômeros de proteína quinase C (PKC) enquanto que o IP₃ tem a importante função na liberação de Ca²⁺ de compartimentos intracelulares (Berridge, 1987) (**figura 5**).

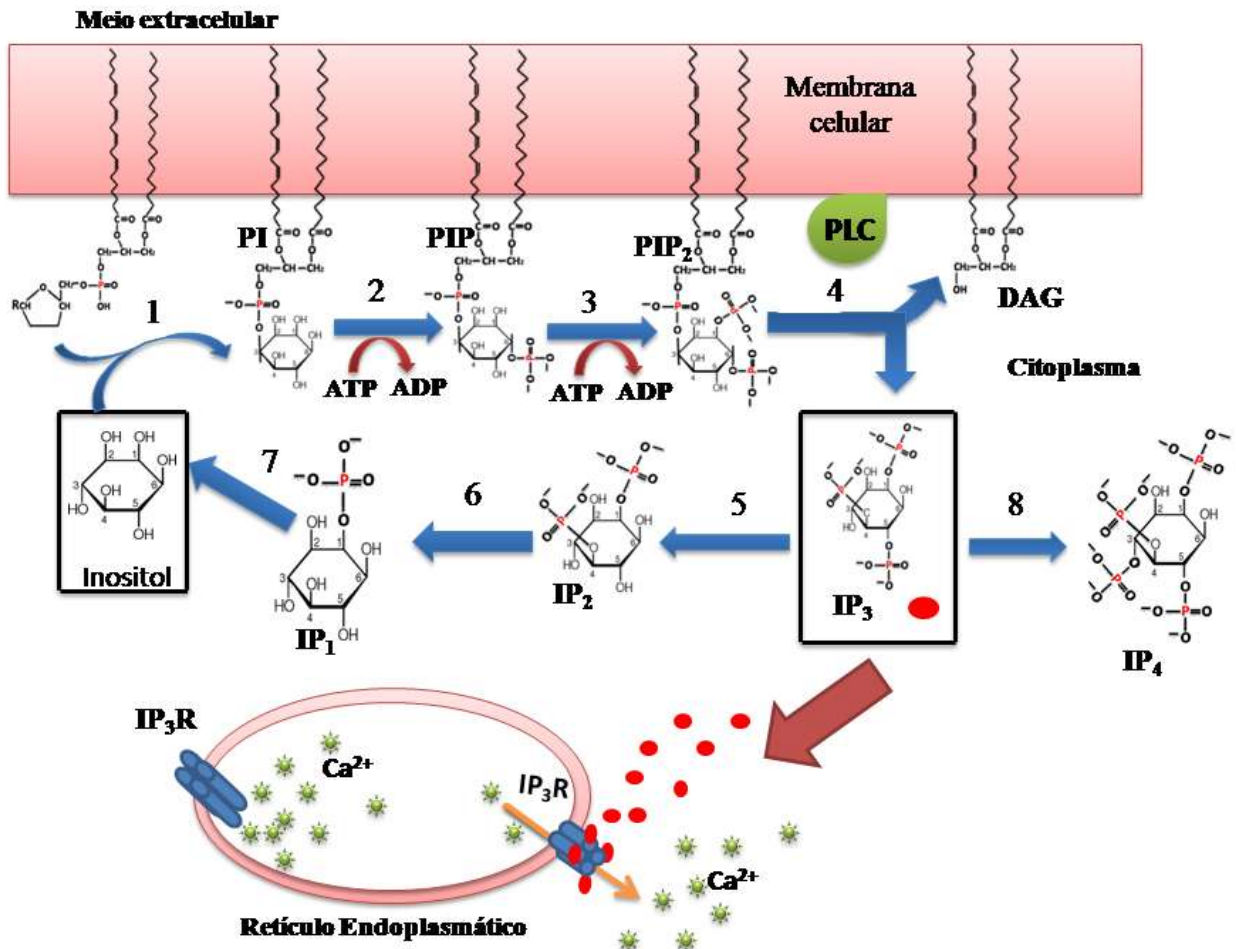
Como qualquer segundo mensageiro, o IP₃ tem vida curta dentro da célula e seu rápido metabolismo ocorre por duas vias: remoção do fosfato na posição 5 do anel inositol pela enzima inositol polifosfato 5-fosfatase (IP₅-fosfatase) que resulta na formação do IP₂ e um fosfato inativo. O IP₂ é posteriormente desfosforilado para inositol monofosfato que pode ser reciclado para formar novos fosfatidilinositois (PI), a segunda via é a fosforilação do IP₃ pela enzima IP₃(1,4,5) 3-quinase, que é dependente de ATP, resultando na formação de IP₄ (Irvine et al., 1986). O IP₄ pode ser rapidamente metabolizado para IP₃ pela mesma enzima que desfosforila IP₃ para formar IP₂ (Pattni et al., 2004).

O IP₄ também participa na mobilização de Ca²⁺ em células de mamíferos (Irvine et al., 1999). Diversos trabalhos reportaram que a presença do IP₄ permite a mobilização de Ca²⁺ induzida por IP₃ de compartimentos diferentes do RE (Cullen et al., 1995; Irvine et al., 1999). Estes trabalhos sugerem ao IP₄ um papel de potencializador na mobilização de Ca²⁺ induzida por IP₃. Uma possível explicação para este fenômeno é o papel protetor que o IP₄ exerce sobre IP₃ uma vez que o IP₄ se liga a IP₅-fosfatase aumentando o tempo de vida útil do IP₃ (Hermosura et al., 2000).

Os fosfatidilinositois IP₅ e IP₆ também estão presentes nas células de mamíferos (Hughes et al., 1990). Porém as concentrações IP₅ e IP₆ não se alteram com a ação de agonista sugerindo que a formação dos fosfoinositois acima de 4 fosfatos não se origina da fosforilação do IP₃ e IP₄ (Heslop et al., 1985).

O surgimento dos fosfatidilinositóis (PI) foi um evento antigo na evolução, este é encontrado desde bactérias (actionobactérias), Apicomplexas, fungos, plantas verdes e metazoas (revisado de Irvine, 2005). Acredita-se que o uso desta via com finalidade de sinalização ativada por um receptor de membrana culminando na produção de IP₃ e DAG através de uma PLC tenha sido um evento mais recente (Michell, 2008).

Figura 5-Esquema clássico da formação e degradação do inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e sua função como segundo mensageiro.



Passo metabólico 1: incorporação do inositol no lípide CDP-diacilglicerol (CDP-DAG) catalisada pela enzima fosfatidilinositol sintase formando fosfatidilinositol (PI). Passo 2: formação do fosfatidilinositol-4-fosfato (PIP) catalisada pela enzima fosfatidilinositol quinase (PI4K). Passo 3: formação do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) a partir da fosforilação do PIP pela enzima fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase (PIPKI). Passo 4: PIP₂ é clivado pela enzima fosfolipase C (PLC) formando inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol DAG. O IP₃ é solúvel e se liga ao receptor de IP₃ (IP₃R) localizado no retículo endoplasmático causando a abertura do canal que culmina na liberação de Ca²⁺. Passo 5: o IP₃ é desfosforilado pela enzima inositol polifosfato 5-fosfatase (IP₅-fosfatase) formando inositol 1,4-bifosfato (IP₂). Passo 6: formação do inositol 1-monofosfato (IP₁) a partir do IP₂ catalisado pela enzima inositol polifosfatase 1-fosfato. Passo 7: formação do inositol a partir do IP₁ pela enzima inositol monofosfatase. Passo 8: formação do inositol 1,3,4,5-tetrafosfato a partir do IP₃ catalisada pela enzima inositol 1,4,5-trifosfato 3-quinase (IP₃ 3-KI).

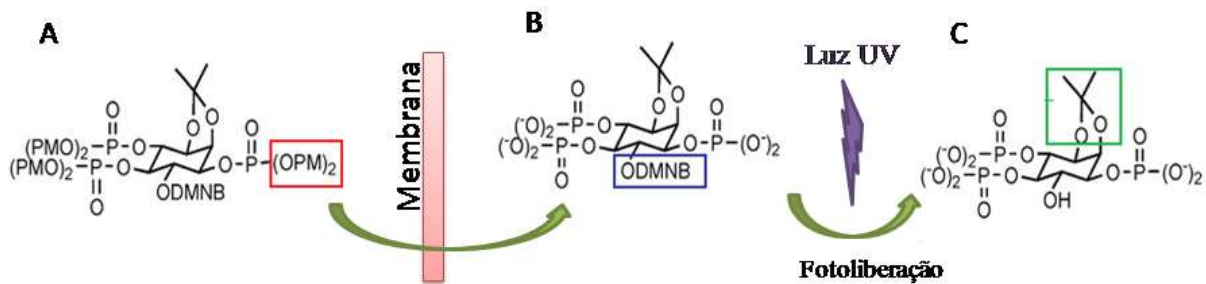
Fonte: Baseado no Berridge, (1987); Irvine et al. (1986); Michell, (1975); Streb et al. (1983); Woodcock, (1996).

1.4.2 Caged-IP₃

O conhecimento das propriedades da molécula de IP₃ em sistemas biológicos permitiu desenvolver ferramentas farmacológicas usadas para investigar a resposta de Ca²⁺ induzida via IP₃ através de IP₃ sintéticos. IP₃ é uma molécula com cargas hidrofílica sendo impermeáveis as hidrofóbicas membranas plasmáticas (Dakin et al., 2006). Ésteres lipofílicos associados ao IP₃ e análogos têm sido usados para facilitar a entrada não invasiva deste segundo mensageiro nas células (Li et al., 1997). A concentração extracelular de Ca²⁺ é em geral 10000 vezes maior que a concentração de Ca²⁺ intracelular, qualquer manipulação invasiva a membrana pode facilmente perturbar a homeostase de Ca²⁺ na célula.

O caged-IP₃ é um composto sintético produzido a partir do mio-inositol, que é permeável a membrana graças à adição de esterases e possui uma molécula 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzil (molécula fotosensível ao UV que impede a ligação do IP₃ ao domínio de ligação do IP₃R) (Hirata et al., 1993). O estímulo do caged-IP₃ com a luz ultravioleta (UV) libera um IP₃ com as mesmas propriedades do IP₃ celular, ou seja, ele é passível de ser degradado ou de se ligar ao receptor de IP₃ (**figura 6**).

Figura 6-Esquema do processo de fotoliberação do caged-IP₃.



Em **A**: caged-IP₃ antes de entrar na célula. Retângulo vermelho evidencia o grupo metil propioniloxi (PM) que confere a lipossolubilidade ao composto. **B**: Estrutura do caged-IP₃ após ataque das esterases que removem o grupo PM. O retângulo azul evidencia o grupo 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzil (DMNB) que é fotosensível ao UV e impede a ligação do IP₃ ao receptor e a ligação das enzimas que degradam IP₃. **C**: Estrutura do IP₃ livre pelo pulso de luz UV, quadrado verde evidencia o pequeno grupo metoximetileno que evita o ressonância dos fosfatos no anel inositol evitando a formação de insômeros de IP₃.

Fonte: Modificado de Dankin et al. (2006).

O caged-IP₃ é uma ferramenta muito útil, pois permite estimular diretamente o receptor de IP₃ (IP₃R) sem a necessidade de agonistas.

A fotoliberação do IP₃ a partir do caged-IP₃ já foi usada para estudar a dinâmica de mobilização de Ca²⁺ em diversos modelos biológicos: neurônios humanos (Stork et al., 2010), células de músculo liso (Rainbow et al., 2009), oocisto de *Xenopus* (Smith et al., 2009), plantas (Monteiro et al., 2005) e no *Trypanosoma brucei* (Huang et al., 2013).

1.4.3 Evidência da via metabólica de fosfatidilinositol e do IP₃ em *Plasmodium*

O surgimento dos diversos fosfatidilinositois (PI) foram eventos antigos na evolução e o uso desta via ativada por um receptor de membrana culminando na produção de segundos mensageiros como IP₃ e DAG tenha sido um evento derivado (Michell, 2008).

Nos Apicomplexas já foram caracterizados genes que codificam as enzimas fosfatidilinositol quinase (PI4K) e fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase PIPKI (Gardner et al., 2002; Wengelnik et al., 2007) e uma enzima PLC δ foi clonada de *Toxoplasma gondii*, porém esta apresentou melhor atividade na presença de PI como substrato ao invés da PIP₂ (Fang et al., 2006).

Já foram caracterizadas a síntese de vários fosfatidilinositois de membrana derivado do PI em *P. falciparum* durante a fase intraeritrocítica (Elabbadi et al., 1994; Gerold et al., 1994). Vaid et al. (2010) reportaram que na fase intraeritrocítica o *P. falciparum* exporta a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (enzima que usa PI como substrato para produzir um tipo de PIP que não é substrato para formação do PIP₂) para o eritrócito e este desempenha função importante no transporte de hemoglobina para o parasita. Fosfatidilinositois são moléculas versáteis que podem sofrer fosforilação em diferentes pontos do anel inositol gerando uma variedade de fosfoinositois de membranas com funções bem distintas, tal como conferir estabilidade a membrana plasmática e vesículas (Koga et al., 2007).

Glicosilfosfatidilinositol (GPI), uma classe de glicolípides formadas por PI ancora a proteína e açúcares na membrana e possui importante papel na patogenicidade da malária (Gerold et al., 1994). No desenvolvimento intraeritrocítico, o *Plasmodium* produz proteínas como MSP1 (merozoite surface protein 1) e MSP2 (merozoite surface protein 2) que são ancoradas na membrana com envolvimento do diacilglicerol DAG) (Haldar et al., 1986; Holder et al., 1985). Interessante que nenhuma GPI em *Plasmodium* parece ser afetada com tratamento da PLC (Gerold et al., 1994), porém foi reportado que a incubação da PLC de *Staphylococcus aureus* em merozoítos e esquizontes é capaz de induzir a atividade de uma proteína de membrana de 76kDa.

Schofield et al. (1993) sugeriram que GPI do *P. falciparum* são os compostos dominantes pela patogenicidade da malária. Esta ideia vem do fato que GPIs têm a habilidade de induzir TNF- α , IL-1 e IFN- γ em macrófagos e causar sintomas graves de malária como hipoglicemia. GPIs também são capazes de induzir óxido nítrico sintase e aumentar a expressão de moléculas adesivas como ICAM-I, VCAM-1 e E-selectin na superfície das células endoteliais através da ativação da PKC (proteína quinase C) e PYK (proteína tirosina quinase) (Schofield et al., 1996; Tachado et al., 1996).

Olszewski et al. (2009), ao estudar os metabólitos encontrados durante a fase intraeritrocítica de *P. falciparum*, reportaram um aumento de mio-inositol. Este dado corrobora o trabalho de Elabbadi et al. (1994) que reportaram a existência da enzima mio-inositol 3- fosfatidil transferase (enzima que forma fosfatidilinositol tendo mio-inositol como substrato) em *P. knowlesi*. Este mesmo grupo mostrou que eritrócitos infectados com *P. knowlesi* e *P. falciparum* são capazes de sintetizar PIP₂.

Elabbadi et al. (1994) ao adicionarem ionomicina (ionóforo de Ca²⁺) em eritrócitos infectados com *P. falciparum* que incorporaram [³H]-inositol monofosfato na presença de cloreto de lítio (um inibidor da desfosforilação do IP₃), verificaram um acúmulo de IP, IP₂ e IP₃ marcados. Os eritrócitos de mamíferos contêm quinases necessárias para formar PIP₂ a partir do PI (Allan, 1982), entretanto eritrócitos não infectados com *Plasmodium* apresentam uma baixa renovação de seu PIP₂ além de outros lípidos de membrana (Van Deenen et al., 1975). A renovação do PIP₂ é aumentada quando o eritrócito é invadido pelo *Plasmodium* (Vial et al., 1990).

A função do IP₃ como segundo mensageiro em *Plasmodium* foi sugerida no trabalho de Martin et al. (1994) que demonstraram a formação de IP₃ e DAG marcados durante o processo de exflagelação em gametócitos de *P. falciparum*.

Passos et al. (1998) demonstraram que *P. chabaudi* isolados e permeabilizados no estágio de trofozoíto liberam Ca²⁺ com a adição do segundo mensageiro IP₃ exógeno. A origem do Ca²⁺ induzida pelo IP₃ provinha de dois compartimentos distintos: um sensível a tapsigargina (retículo endoplasmático) e um sensível a cloroquina (compartimentos ácidos). Este foi o primeiro trabalho a relacionar diretamente a mobilização de Ca²⁺ com o IP₃. Entretanto, devido à incapacidade do IP₃ de atravessar a membrana, esta mobilização de Ca²⁺ não pode ser testada no ambiente natural do parasita (dentro do eritrócito) e nem com a membrana celular do parasita íntegra.

Como descrito anteriormente, Hotta et al. (2000) reportaram que o hormônio melatonina induz mobilização de Ca²⁺ em *P. chabaudi* e *P. falciparum* sendo que esta resposta

é abolida na presença do inibidor de fosfolipase C, adicionando uma importante evidência farmacológica do uso da via dependente de PLC/IP₃.

Raabe et al. (2011) estudaram gametócitos *P. berghei* transfectados com uma construção que gera uma sonda fluorescente que se liga ao PIP₂. Quando o PIP₂ fluorescente é clivado pela PLC, o domínio fluorescente permanece ligado ao IP₃. Neste modelo, ao estimular a atividade da PLC deste parasita com ácido xanturênico, este grupo reportou um deslocamento da fluorescência da membrana para o citoplasma, um padrão de deslocamento esperado para a função do segundo mensageiro IP₃.

Enomoto et al. (2012) demonstraram uma inibição da mobilização espontânea de Ca²⁺ em *P. falciparum* com o uso da droga 2-aminoetil difenilborinato (2-APB), um inibidor do receptor de IP₃. Esta inibição causou a morte dos parasitas no estágio intraeritrocítico indicando a importância desta via de sinalização no parasita da malária.

O conjunto destes trabalhos demonstra que *Plasmodium* usa a via de sinalização mediada por IP₃. Entretanto, falta caracterizar um componente básico para o funcionamento desta via: o receptor de IP₃.

1.5 Receptor Inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R)

Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R) são canais intracelulares de Ca²⁺ que têm função crítica na geração do sinal de Ca²⁺ que acompanha as células estimuladas com diferentes tipos de agonistas (Berridge, 1993). A abertura dos IP₃R depende da ligação com o segundo mensageiro IP₃ e do Ca²⁺ no sítio do receptor que está voltado ao citossol (Smith et al., 2009). Todas as células nucleadas de mamíferos contêm uma ou mais das três isoformas do IP₃R (IP₃R tipo I, tipo II e tipo III) (Joseph et al., 2005) enquanto que em invertebrados possuem somente uma isoforma do IP₃R (Baylis et al., 2012).

Em vertebrados, a proteína que forma o IP₃R tem aproximadamente 2700 resíduos, mas para que receptor fique funcional esta proteína tem que formar um homotetrâmero (Taylor et al., 1999). Os IP₃R geralmente são organizados em três partes: um domínio de ligação com IP₃ na região N-terminal (região que efetivamente se liga ao IP₃), o domínio do canal localizado na região C-terminal (onde se localizam as regiões transmembrânicas para o acoplamento do receptor na membrana) e um domínio regulatório/acoplamento na região intermediária que possui sítios de ligação a diversas moléculas como PKA, calmodulina, ATP e Ca²⁺ (Patel et al., 1999).

Além do sítio de ligação ao IP_3 , o IP_3R apresenta ao menos dois sítios de ligação com Ca^{2+} , estes sítios ajudam a regular a sensibilidade deste receptor ao IP_3 permitindo um melhor controle na homeostase de Ca^{2+} , por exemplo, o Ca^{2+} em baixas concentrações é capaz de estimular IP_3R do tipo I e inibir o mesmo receptor em altas concentrações (Taylor et al., 2002). Além do Ca^{2+} , os IP_3R podem ser regulados por eventos de fosforilação ou associação a outras proteínas graças aos estímulos de sinais intracelulares como AMP_c , ATP e intermediários da via glicolítica (Foskett et al., 2007).

Os receptores de rianodina (RyR) pertencem a uma família de canal de Ca^{2+} que compartilha características com o IP_3R : localizam-se no RE, possuem 3 isoformas em mamíferos, o canal é formado por um complexo homotetrâmero, pode ser regulado por Ca^{2+} , PKA e calmodulina além de possuir um poro iônico muito similar ao IP_3 (revisado de Van Petegem, 2012). Entretanto os RyR não se ligam ao IP_3 e sim ao segundo mensageiro ribose ADP cíclica (cADPR) (Chini et al., 2002). IP_3R e RyR compartilham uma história evolutiva em comum (Mackrill, 2012) e revela parte da diversidade dos canais de Ca^{2+} .

O conhecimento das propriedades e sítios de ligação do IP_3R em vertebrados permitiu algumas estratégias para construção de sensores e moduladores de IP_3 . Uchiyama et al. (2002) clonaram um domínio de ligação modificado do receptor de IP_3 de camundongo, construção denominada IP_3 -esponja, capaz de se ligar a molécula de IP_3 produzido pela célula, competindo com os receptores nativos de IP_3 . Esta construção é uma ferramenta molecular importante uma vez que permite observar o que ocorre com a dinâmica de Ca^{2+} quando se limita a disponibilidade deste segundo mensageiro.

Outra construção interessante para monitorar IP_3 , é um sensor de IP_3 conhecida com pelo nome IRIS (nome dedicado ao deus grego do arco-íris). O IRIS é baseado no domínio de ligação do receptor de IP_3 tipo 1 em camundongos que foi inserida entre duas proteínas (Venus e ECFP) que emitem luz em comprimento de onda específico quando ficam próximas (sistema FRET). O IRIS atua como um sensor intracelular de IP_3 e não compete fortemente com IP_3R comparado ao IP_3 -esponja (Matsu-ra et. al., 2006).

1.5.1 Busca pelo receptor de IP_3 em *Plasmodium*

O receptor de IP_3 está bem caracterizado em vertebrados e diversos grupos de invertebrados. O conhecimento da sequência dos receptores destes grupos é largamente usado como sondas na busca que envolve técnicas de bioinformática.

Prole et al. (2011) usaram as regiões conservadas dos receptores de IP₃ e do receptor de rianodina em mamíferos, em particular a região do poro responsável pela condutividade iônica, para realizarem um BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) nos genomas de diversos parasitas: *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. vivax*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Babesia bovis*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* e *Schistosoma mansoni*. Porém, este trabalho não encontrou nenhum gene candidato para receptor de IP₃ nos parasitas do grupo dos Apicomplexa (*Plasmodium*, *Toxoplasma* e *Babesia*).

A despeito das evidências de que o *Plasmodium* usa IP₃ como segundo mensageiro, os domínios conservados do IP₃R em animais (tal como domínio de ligação ao IP₃) não são encontrados no genoma de *Plasmodium*, indicando que no Apicomplexa estes receptores sejam mais similares com as plantas (Nagamune et al., 2006).

Quanto à caracterização do IP₃R, as plantas terrestres estão em uma situação similar a de *Plasmodium* e outros Apicomplexas. Há evidência de que receptores de IP₃ participam na sinalização de Ca²⁺ estimulada por ácido abscísico (Meimoun et al., 2009). Lin et al. (2004), usando a técnica de microarray, tentaram identificar genes relacionados a via de sinalização por inositol, entretanto os candidatos apontados pela técnica não atuam como IP₃R em plantas. O uso do BLAST tendo como sonda a região de ligação do receptor de IP₃ em camundongos não revelou nenhum candidato no genoma de diversas plantas (Krinke et al., 2007).

Hirata et al. (1990) desenvolveram uma coluna de cromatografia de afinidade ao IP₃. Sintetizando um composto análogo ao IP₃ (2-O-[4-(5-aminoetil-2-hidroxifenilazo) benzoil]-1,4,5 tri-O-fosfo-mio-inositol) capaz de se ligar a uma coluna de sefarose (5-carboxipentil-sefarose), este grupo foi capaz de purificar proteínas que tem afinidade ao IP₃ como IP₅-fosfatase e IP₃ 3- KI. Kishigami et al. (2001) utilizaram uma coluna similar para purificar proteínas do extrato de células do olho de polvo *Todarodes pacificus* que se ligavam ao IP₃. Com esta técnica, este grupo conseguiu identificar uma fosfolipase C (PLC) em *T. pacificus*.

Uma vez que as ferramentas de bioinformática ainda não apontaram candidatos para receptor de IP₃ em *Plasmodium*, o uso de uma coluna de cromatografia de afinidade ao IP₃ pode trazer resultados interessantes na identificação deste receptor em Apicomplexa e em plantas.

1.6 Digestão da hemoglobina em *Plasmodium* e os efeitos tóxicos da formação da hemina

Durante o ciclo intraeritrocítico do *Plasmodium* ocorre uma intensa endocitose de hemoglobina como fonte de nutriente (Langreth, 1976).

Elliot et al. (2007) em um elegante trabalho, demonstraram que a absorção da hemoglobina pelo *P. falciparum* abrange quatro processos distintos. Um deles descreve o parasita engolindo o citosol da célula hospedeira (que deram o nome de "grande gole"). Além deste, outros dois processos ocorrem de forma semelhante a uma endocitose (citóstoma) que levam à formação de vesículas pequenas ou vesículas em forma de longos tubos finos. O último processo é semelhante a uma fagocitose e é similar ao "grande gole". A formação do citóstoma constitui um serviço de transporte das vesículas que finalmente entrega hemoglobina parcialmente degradadas para o vacúolo alimentar. Estes estudos foram conduzidos por meio de análise de microscopia eletrônica de seção fina no parasita em diferentes estágios do ciclo intraeritrocítico.

A degradação bioquímica da hemoglobina dentro do parasita é um processo especializado e eficiente, mas isto gera a liberação da hemina (ferro protoporfirina IX).

Altas concentrações de hemina livre promove um efeito detergente que danifica a membrana celular (Schmitt et al., 1993) além de inibir uma ampla variedade de enzimas como proteases (Aft et al., 1983). Hemina em baixas concentrações é capaz de causar peroxidação lipídica (Graça-Souza et al., 2006). Além disto, a hemina e o próprio ferro presente nesta molécula podem atuar como agente pró-oxidante danificando o DNA e promovendo a decomposição de peróxidos orgânicos (Van der Zee et al., 1996). A toxicidade da hemina é uma das barreiras que *Plasmodium* precisa lidar para completar seu desenvolvimento intraeritrocítico.

1.6.1 Mecanismos de defesa contra hemina em *Plasmodium*

1.6.1.1 Hemozoína e sua formação

O mecanismo de desintoxicação da hemina mais importante encontrado em *Plasmodium* é sua conversão da hemina em hemozoína (β -hematina) (Sherman et al., 1965). Em *P. falciparum*, a hemina é sequestrada no vacúolo digestivo e polimerizada em estrutura cristalina marrom escura denominada hemozoína, também conhecida como pigmento malárico. Durante o ciclo intraeritrocítico, metade da hemoglobina presente no eritrócito

infectado é convertida em hemozoína (Moore et al., 2006) e em trofozoítos de *P. falciparum*, 95% da hemina livre é convertida em hemozoína (Egan et al., 2002).

A estrutura da hemozoína nas espécies de *Plasmodium* é mantida por interações iônicas e ligação de hidrogênio entre os agrupamentos da hemina (Pagola et al., 2000). Há diversas propostas que explicam a formação da hemozoína em *Plasmodium*.

Os primeiros trabalhos que estudaram a origem da hemozoína em *Plasmodium* sugeriram que esta era formada por hemoglobina parcialmente degradada e não indicavam a presença de nenhum catalisador além das enzimas responsáveis pela proteólise da hemoglobina (Goldie et al., 1990).

Posteriormente, Slaler et al. (1992), na busca de um catalisador na formação de hemozoína, identificaram e caracterizaram uma proteína que apresentava uma atividade “heme polimerase” dependente de temperatura e pH nos extratos de trofozoíto.

Entretanto Dorn et al. (1995) reportaram um processo auto catalítico, promovido por uma hemozoína pré formada ao invés de uma enzima. Neste trabalho os autores demonstraram a formação da hemozoína em amostras livres de proteína e que a adição de diversas proteases não alterava a formação deste cristal.

Bendrat et al. (1995) sugeriram a participação de lipídios de membrana na formação da hemozoína, indicando que o processo auto catalítico proposto no trabalho de Dorn et al. (1995) era causado pela contaminação destes lipídeos na amostra.

Entretanto a participação de proteínas ricas em histidina também foi reportada como importantes componentes no processo de formação da hemozoína em *P. falciparum* (Sullivan et al., 2002). Em especial a proteína HRPII, abundante em *P. falciparum*, capaz de induzir a formação de hemozoína *in vitro*. Esta proteína tem a capacidade de se ligar a várias moléculas de hemina graças à interação com o aminoácido histina (Choi et al., 1999), induzindo assim a formação do cristal por facilitar a formação de dímero de hemina (Pandey et al., 2003).

Muitos trabalhos contestaram a importância das proteínas ricas em histidina no processo de polimerização da hemina. Papalexis et al. (2001) reportaram que apenas uma quantidade pequena da HRPII eram encontradas no vacúolo digestivo. Pandey et al. (2003) reportaram que somente a presença da HRPII *in vitro* não aumentava a velocidade de formação da hemozoína de forma compatível *in vivo* sugerindo a importância da interação desta proteína com lipídeos. Interessante que os parasitas *P. berghei* e *P. vivax* não possuem a proteína HRPII, porém são capazes de formar hemozoína.

Jani et al. (2008) reportaram a existência de uma proteína (número de acesso no Plasmodb: PF14_0446) conservada em *Plasmodium* capaz de converter hemina em

hemozoína no vacúolo digestivo, sugerindo esta proteína como alvo interessante para tratamento contra malária.

O bloqueio da formação da hemozoína é o principal alvo das terapias antimaláricas (Rathore et al., 2005). Drogas importantes como cloroquina e artemisinina atuam na formação da hemozoína embora a natureza bioquímica desta inibição ainda seja alvo de investigação.

1.6.1.2 Heme oxygenase (HO)

A degradação da hemina a biliverdina (BV), catalisada pela enzima heme oxigenase (HO) é a via principal para o catabolismo de hemoproteínas em mamíferos e também é uma estratégia para lidar com a toxicidade da hemina (Docherty et al., 1984). HO é encontrada em todos os vertebrados, é amplamente distribuída em insetos, já foi indentificada em plantas, cianobactérias, algas e em algumas bactérias patogênicas (revisado de Kikuchi et al., 2005).

A heme oxigenase é capaz de clivar a hemina utilizando NADPH e O₂ na presença de P450 redutase, gerando biliverdina, CO e Fe²⁺ (Schacter et al., 1972). A transformação da hemina em biliverdina (BV), catalisada pela HO, envolve três passos. No primeiro passo, a hemina férrica é oxidada a α -meso-hidroxihemina, com o uso de 2 elétrons cedidos pela P450 redutase e uma molécula de oxigênio. O α -meso-hidroxihemina é então convertido a verdohemina ferroso, em uma reação que utiliza 2 elétrons, uma molécula de oxigênio e libera CO. No passo final, o verdohemina é convertido à biliverdina ferrosa, com consumo de 3 elétrons e mais uma molécula de oxigênio. O íon ferroso é liberado, seguido da dissociação da biliverdina da enzima (Wang et al., 2003). BV é então convertido em bilirrubina (BR) por uma segunda enzima, a biliverdina-redutase (BVR) na presença do NADPH que atua como doador de elétrons (Docherty et al., 1984; Kutty et al., 1988).

Em humanos há duas isoformas da HO (HO-1 e HO-2) expressas por genes diferentes, mas com propriedades bioquímicas similares (McCoubrey et al., 1997). A HO-2 é expressa constitutivamente enquanto que a expressão da HO-1 é regulada por diversos fatores como estresse oxidativo, citocinas, metais pesados e hipóxia (Kikuchi et al., 2005). Esta regulação confere uma importante função na citoproteção em diversas células e tecidos.

Em grupos como répteis, aves, peixes e insetos a atividade da HO é importante para regular as concentrações de BV que é usada diretamente na pigmentação (Terry et al., 2002).

Em plantas e cianobactérias, a atividade da HO tem importante função na produção de biliverdina IX α , composto chave para síntese de fitobilina que é usado como sensor de luz vermelha e infravermelha (Beale, 1991).

Em algumas bactérias patogênicas, a atividade da HO tem como função obter ferro como nutriente a partir da hemina do hospedeiro além de regular a produção de toxinas protéicas (Schmitt et al., 1993).

Okada (2009) reportou a existência de uma heme oxigenase em *P. falciparum* (*PfHO*), número de acesso PlasmoDB: PF10_0116. Okada (2009) demonstrou que a *PfHO* é capaz de converter hemina em bilirrubina na presença de quelantes de ferro (ferrodoxina e de ferroxamina). Este trabalho revelou uma propriedade interessante da *PfHO*: a capacidade de converter hemina em biliverdina (atividade heme oxigenase) e biliverdina em bilirrubina (atividade biliverdina redutase). O papel da *PfHO* foi considerada como mecanismo secundário de lidar com o hemina livre (**figura 7**). No genoma de *P. falciparum* não foi encontrado uma biliverdina redutase (BVR), enzima que converte a biliverdina (BV) em bilirrubina (BR) (Gardner et al., 2002).

Sartorello et al. (2010) também demonstraram a atividade heme oxigenase da *PfHO*. Entretanto, a afinidade da *PfHO* com hemina (K_D $4 \pm 2 \mu M$) foi considerada baixa comparada a heme oxigenase (HO) de humanos ($0.84 \pm 0.2 \mu M$) (Wilks et al., 1996) sugerindo uma baixa eficiência em remover hemina no meio celular.

Kumar et al. (2008) demonstraram que os produtos de degradação da hemina (BV e BR), em concentrações micromolares, inibem o crescimento de *P. falciparum* no ciclo intraeritrocítico pela formação de espécies reativas de oxigênio. Este trabalho sugere que a falta de uma via clássica de detoxificação do heme a partir de uma HO é uma forma de proteção contra os efeitos tóxicos da BV e BR. Considerando este fato, é notável a capacidade de *P. falciparum* de realizar a biossíntese da hemina apesar da sua toxicidade (Sato et al., 2004; Surolia et al., 1992). O genoma deste parasita codifica todas as enzimas necessárias para a formação da hemina (Gardner et al., 2002), sugerindo um papel importante para a hemina no ciclo do parasita.

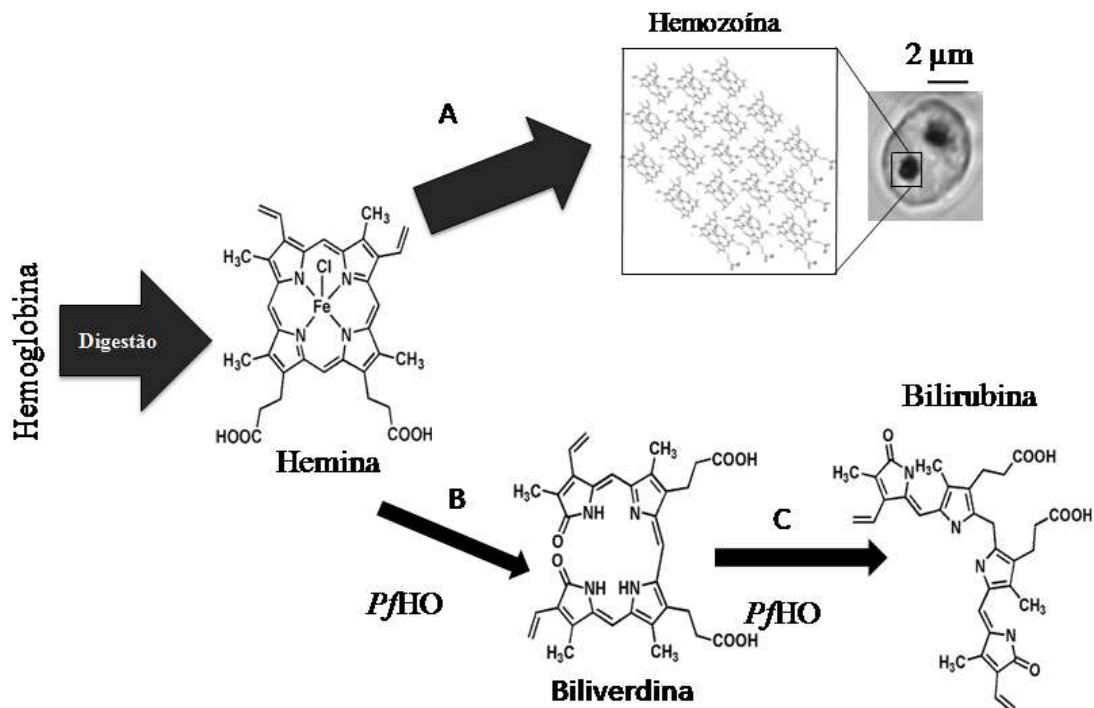
P. berghei e *P. yoelii* ativam a HO do hepatócito e o aumento da concentração de BV resultante da atividade HO do hospedeiro aumenta a parasitemia na fase hepática (Epiphany et al., 2008). Este trabalho revelou que o parasita pode se beneficiar da heme oxigenase do hospedeiro, uma vez que baixas concentrações de hemina evita processos inflamatórios.

A atividade heme oxigenase e biliverdina redutase da *PfHO* ainda é controversa. Sigala et al., 2012, ao usarem uma sonda fluorescente que se liga a BV em *P. falciparum*, não detectou indícios da atividade HO. Este mesmo grupo, trabalhando com a proteína *PfHO* purificada, não conseguiu obter *in vitro* a conversão de hemina para biliverdina embora tenha

detectado a ligação entre hemina e *PfHO*. Este trabalho sugeriu que a *PfHO* não possui a função de participar da via de desintoxicação da hemina através da produção de BV e BR.

Considerando a importância para o parasita em lidar com a hemina no estágio intraeritrocítico, a investigação da atividade e função da *PfHO* pode revelar importantes informações a respeito da biologia e estratégia de sobrevivência deste parasita.

Figura 7-Esquema das vias de remoção da hemina em *P. falciparum*.



Em **A**: seta evidenciando a formação da hemina em hemozoína (cristal escuro evidenciado na foto feita em microscopia confocal). Principal mecanismo de detoxificação da hemina. **B**: seta indicando a atividade heme oxigenase da *PfHO*, que converte hemina em biliverdina. **C**: seta indicando a atividade biliverdina redutase, converte biliverdina em bilirubina.

Fonte: Baseado em Okada (2009); Sartorello et al. (2010); Sherman et al. (1965).

1.6.2 Protoporfirina XI e metaloprotoporfirinas

A protoporfirina XI é um composto formado por um anel tetrapirrólico precursor de diversas moléculas biológicas importantes como a hemina, a clorofila e citocromo C (Battersby et al., 1980). Este é capaz de formar metaloprotoporfirinas ao se associar a diferentes íons metálicos pela remoção dos íons H^+ presentes nos grupos internos N-H (Borovkov et al., 1999).

Nos organismos as metaloprotoporfirinas são geralmente associadas às proteínas formando estruturas de grande importância biológica, como a hemoglobina, a mioglobina (papel no armazenamento de oxigênio nos músculos) e em várias enzimas envolvidas em processos metabólicos como os citocromos e vitaminas (revisado de Leeper et al., 1989).

Na forma livre, as metaloprotoporfirina têm sido caracterizadas como moduladores da atividade heme oxigenase (Vreman et al., 1981). Esta propriedade das metaloprotoporfirinas tem sido explorada para tratar pacientes com alta concentração de BR (Vreman et al., 2001) além de ótima ferramenta farmacológica para estudar o efeito da modulação da heme oxigenase em sistemas biológico e *in vitro* (Drummond et al., 1986).

O metal localizado na protoporfirina altera as propriedades modulatórias sobre a heme oxigenase. O zinco protoporfirina XI (Zn-PPIX) é um clássico e eficiente inibidor da HO. Zn-PPIX é formado naturalmente no organismo especialmente no período de depleção do ferro (Labbe et al., 1999).

O cobalto protoporfirina XI (Co-PPIX) é um conhecido indutor da atividade heme oxigenase e foi um dos primeiros íons identificados a exibir esta propriedade de indução *in vivo* em diversos tecidos (Maine et al., 1977).

Estudos em que o ferro da hemina é substituído sinteticamente por outros metais formando metaloprotoporfirinas que não são encontradas em sistemas biológicos, tal como caso da Ni-protoporfirina IX, ampliam as opções do uso clínico e experimental das metaloprotoporfirinas.

1.6.3 Ação das metaloprotoporfirinas em *Plasmodium*

Os derivados sintéticos da hemina, denominados metaloprotoporfirinas, têm sido caracterizados como inibidores por competição da enzima heme oxigenase (Drummond et al., 1981).

Metaloprotoporfirinas são potentes inibidores da polimerização *in vitro* da hemina (Basilico et al., 1997; Martiney et al., 1996; Monti et al., 1999). O íon metálico localizado no centro da protoporfirina IX tem importante função em inibir as interações π - π formadas entre a hemina e o íon metálico (Cole et al., 2000).

A atividade antimalárica de diversas metaloprotoporfirinas já foi testada (Begum et al., 2003). Entretanto, foram necessárias concentrações de até 190 μ M para obter o valor do IC₅₀ em alguns destes compostos após 72 horas de incubação em cultura de *P. falciparum*.

O potencial antimalárico das metaloprotoporfirinas é limitado pela baixa solubilidade em meio aquoso e baixa permeabilidade em membranas biológicas (Begum et al., 2003; Borovkov et al., 1999). Esta limitação levou diversos trabalhos a usar polímeros e micelas associados a metaloprotoporfirina melhorando seu potencial terapêutico. (Ding et al., 2011; Engelmann et al., 2007).

Goldberg (2007) demonstrou que, além do metal, a alteração no anel da protoporfirina XI é capaz de otimizar as propriedades oxidativas e solubilidade.

A via de detoxificação da hemina é um importante alvo para ação de antimaláricos como a cloroquina (Gorka et al., 2013). Até o presente trabalho, a modulação pelas metaloprotoporfirinas na enzima heme oxigenase de *P. falciparum* nunca foi testada. Este estudo pode revelar características interessantes sobre o funcionamento desta enzima e explorar novas vias de inibição do catabolismo do heme neste parasita.

6 CONCLUSÕES

No trabalho envolvendo o papel do IP₃ na transdução de sinal em *P. falciparum*, demonstramos que trofozoítos não permeabilizados dentro do eritrócito (ambiente natural) são capazes de mobilizar Ca²⁺ na presença do segundo mensageiro IP₃ através de um compartimento sensível a tapsgargina.

A sensibilidade do *P. falciparum* ao IP₃ não é constante durante o ciclo intraeritrocítico uma vez que esquizontes não segmentados não são capazes de mobilizar Ca²⁺ na presença deste mensageiro.

O hormônio melatonina é capaz de estimular diretamente IP₃/IP₄ citossólicos e induz Ca²⁺ através da via PLC/IP₃R em *P. falciparum*.

O uso de sensores como IRIS e de proteína que tamponam o IP₃ celular como IP₃ esponja expressos de forma constitutiva provavelmente afetam a viabilidade celular do *P. falciparum*.

O uso de coluna de cromatografia de afinidade ao IP₃ apresentou 51 proteínas candidatas ao receptor de IP₃ em *P. falciparum*.

No trabalho envolvendo a função da heme oxigenase de *P. falciparum* (PfHO) confirmamos a atividade biliverdina redutase (BVR) *in vitro* nesta enzima.

A atividade BVR da PfHO é modulada negativamente por diversas melatoprotoporfirinas (Zn-PPIX, Ni-PPIX, Mn-PPIX, Cu-PPIX, Co-PPIX) e protoporfirina sem metal (PPIX) *in vitro*. Zn-PPIX é capaz de, em duas horas, reduzir consideravelmente a área da hemozoína em eritrócitos infectados por em *P. falciparum*.

O encapsulamento das metaloprotoporfirina aumenta consideravelmente o potencial antimalárico destes compostos.

Hemina e biliverdina são capazes de modular o ciclo intraeritrocítico do *P. falciparum*. O ensaio de ligação proteína-BV evidenciou a enolase de *P. falciparum* como um potencial sensor de BV.

REFERÊNCIAS*

- Abu Bakar N, Klonis N, Hanssen E, Chan C, Tilley L. Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Cell Sci*. 2010 Feb 1;123(Pt 3):441-50.
- Aft RL, Mueller GC. Hemin-mediated DNA strand scission. *J Biol Chem*. 1983 Oct 10;258(19):12069-72.
- Allan D. Inositol lipids and membrane function in erythrocytes. *Cell Calcium*. 1982 Oct;3(4-5):451-65.
- Alves E, Bartlett PJ, Garcia CR, Thomas AP. Melatonin and IP3-induced Ca²⁺ release from intracellular stores in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* within infected red blood cells. *J Biol Chem*. 2011 Feb 18;286(7):5905-12.
- Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*. 2006 Feb;12(2):220-4.
- Arnold JD, Berger AE, Martin DC. Chemical agents effective in mediating control of growth and division synchrony of *plasmodium berghei* in pinealectomized mice. *Journal of Parasitology*. 1969;55(3):617-625.
- Asawamahasukda W, Ittarat I, Chang CC, McElroy P, Meshnick SR. Effects of antimalarials and protease inhibitors on plasmodial hemozoin production. *Mol Biochem Parasitol*. 1994 Oct;67(2):183-91.
- Bagnaresi P, Alves E, da Silva HB, Epiphanyo S, Mota MM, Garcia CR. Unlike the synchronous *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi* infection, the *P. berghei* and *P. yoelii* asynchronous infections are not affected by melatonin. *Int J Gen Med*. 2009;2:47-55.
- Bannister L, Mitchell G. The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol*. 2003 May;19(5):209-13.
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99(25):16093-8.
- Basilico N, Monti D, Olliaro P, Taramelli D. Non-iron porphyrins inhibit beta-haematin (malaria pigment) polymerisation. *FEBS Lett*. 1997 Jun 9;409(2):297-9.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [Update 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Battersby AR, Fookes CJ, Matcham GW, McDonald E. Biosynthesis of the pigments of life: formation of the macrocycle. *Nature*. 1980 May 1;285(5759):17-21.

Baylis HA, Vazquez-Manrique RP. Genetic analysis of IP3 and calcium signalling pathways in *C. elegans*. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 2012 Aug;1820(8):1253-68.

Baylis HA, Vazquez-Manrique RP. Genetic analysis of IP3 and calcium signalling pathways in *C. elegans*. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 2012 Aug;1820(8):1253-68.

Begum K, Kim HS, Kumar V, Stojiljkovic I, Wataya Y. In vitro antimalarial activity of metalloporphyrins against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res*. 2003 Jun;90(3):221-4.

Bendrat K, Berger BJ, Cerami A. Haem polymerization in malaria. *Nature*. 1995 Nov 9;378(6553):138-9.

Beraldo FH, Almeida FM, da Silva AM, Garcia CR. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J Cell Biol*. 2005 Aug 15;170(4):551-7.

Beraldo FH, Garcia CR. Products of tryptophan catabolism induce Ca²⁺ release and modulate the cell cycle of *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J Pineal Res*. 2005 Oct;39(3):224-30.

Berkelman TR, Lagarias JC. Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1986 Jul;156(1):194-201.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003 Jul;4(7):517-29.

Berridge MJ, Dawson RM, Downes CP, Heslop JP, Irvine RF. Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem J*. 1983 May 15;212(2):473-82.

Berridge MJ, Lipke H. Changes in calcium-transport across calliphora salivary-glands induced by 5-Hydroxytryptamine and cyclic-nucleotides. *Journal of Experimental Biology*. 1979;78(Feb):137-48.

Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 2009 Jun;1793(6):933-40.

Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 1993 Jan 28;361(6410):315-25.

Berridge MJ. Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction. *Ann N Y Acad Sci*. 1987;494:39-51.

Bhowmick IP, Kumar N, Sharma S, Coppens I, Jarori GK. *Plasmodium falciparum* enolase: stage-specific expression and sub-cellular localization. *Malar J*. 2009;8:179.

Biagini GA, Bray PG, Spiller DG, White MR, Ward SA. The digestive food vacuole of the malaria parasite is a dynamic intracellular Ca^{2+} store. *J Biol Chem*. 2003 Jul 25;278(30):27910-5.

Borovkov VV, Lintuluoto JM, Inoue Y. Convenient method for efficient iron and manganese ion insertion into various porphyrins under mild conditions. *Synlett*. 1999 Jan(1):61-2.

Boyd GH. Induced variations in the asexual cycle of *Plasmodium cathemerium*. *American Journal of Hygiene*. 1929 Jan;9(1):181-7.

Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, et al. Dual signaling of human *Mella* melatonin receptors via $G(i2)$, $G(i3)$, and $G(q/11)$ proteins. *Mol Endocrinol*. 1999 Dec;13(12):2025-38.

Budu A, Peres R, Bueno VB, Catalani LH, Garcia CR. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine modulates the cell cycle of malaria parasites. *J Pineal Res*. 2007 Apr;42(3):261-6.

Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB, Kooij TW, Perteu M, Silva JC, et al. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature*. 2002 Oct 3;419(6906):512-9.

Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Oct;15(4):564-94.

Cassone VM, Natesan AK. Time and time again: The phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *Journal of Biological Rhythms*. 1997 Dec;12(6):489-97.

Chini EN, De Toledo FG. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate: a new intracellular second messenger? *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Jun;282(6):C1191-8.

Choi CY, Cerda JF, Chu HA, Babcock GT, Marletta MA. Spectroscopic characterization of the heme-binding sites in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2. *Biochemistry*. 1999 Dec 21;38(51):16916-24.

Christ K, Ruttinger HH, Hopfner M, Rothe U, Bendas G. The detection of UV-induced membrane damages by a combination of two biosensor techniques. *Photochem Photobiol*. 2005 Nov-Dec;81(6):1417-23.

Cole KA, Ziegler J, Evans CA, Wright DW. Metalloporphyrins inhibit beta-hematin (hemozoin) formation. *J Inorg Biochem*. 2000 Jan 30;78(2):109-15.

Crabb BS, Rug M, Gilberger TW, Thompson JK, Triglia T, Maier AG, et al. Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods Mol Biol*. 2004;270:263-76.

Cullen PJ, Chung SK, Chang YT, Dawson AP, Irvine RF. Specificity of the purified inositol (1,3,4,5) tetrakisphosphate-binding protein from porcine platelets. *FEBS Lett*. 1995 Jan 30;358(3):240-2.

Dakin K, Li WH. Cell membrane permeable esters of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate. *Cell Calcium*. 2007 Sep;42(3):291-301.

Das S, Shevade S, LaCount DJ, Jarori GK. Plasmodium falciparum enolase complements yeast enolase functions and associates with the parasite food vacuole. *Mol Biochem Parasitol*. 2011 Sep;179(1):8-17.

Deda DK, Uchoa AF, Carita E, Baptista MS, Toma HE, Araki K. A new micro/nanoencapsulated porphyrin formulation for PDT treatment. *Int J Pharm*. 2009 Jul 6;376(1-2):76-83.

Ding H, Sumer BD, Kessinger CW, Dong Y, Huang G, Boothman DA, et al. Nanoscopic micelle delivery improves the photophysical properties and efficacy of photodynamic therapy of protoporphyrin IX. *J Control Release*. 2011 May 10;151(3):271-7.

Ding L, Balzarini J, Schols D, Meunier B, de Clercq E. Anti-human immunodeficiency virus effects of cationic metalloporphyrin-ellipticine complexes. *Biochem Pharmacol*. 1992 Oct 20;44(8):1675-9.

Divirgilio F, Steinberg TH, Swanson JA, Silverstein SC. Fura-2 Secretion and Sequestration in Macrophages - a Blocker of Organic Anion Transport Reveals That These Processes Occur Via a Membrane-Transport System for Organic-Anions. *Journal of Immunology*. 1988 Feb 1;140(3):915-20.

Docherty JC, Brown SB. Haem degradation in human haemoglobin in vitro. Separation of the contribution of the alpha- and beta-subunits. *Biochem J*. 1984 Sep 1;222(2):401-6.

Doerig C, Billker O, Haystead T, Sharma P, Tobin AB, Waters NC. Protein kinases of malaria parasites: an update. *Trends Parasitol*. 2008 Dec;24(12):570-7.

Doerig CD. Signal transduction in malaria parasites. *Parasitol Today*. 1997 Aug;13(8):307-13.

Dore S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R, Hester LD, Guastella D, et al. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 2;96(5):2445-50.

Dorin D, Semblat JP, Pouillet P, Alano P, Goldring JPD, Whittle C, et al. PfPK7, an atypical MEK-related protein kinase, reflects the absence of classical three-component MAPK pathways in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Molecular Microbiology*. 2005 Jan;55(1):184-96.

Dorn A, Stoffel R, Matile H, Bubendorf A, Ridley RG. Malarial haemozoin/beta-haematin supports haem polymerization in the absence of protein. *Nature*. 1995 Mar 16;374(6519):269-71.

Drummond GS, Kappas A. Manganese and zinc blockade of enzyme induction: studies with microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Oct;76(10):5331-5.

Drummond GS, Kappas A. Potent heme-degrading action of antimony and antimony-containing parasiticidal agents. *J Exp Med*. 1981 Feb 1;153(2):245-56.

Drummond GS, Kappas A. Sn-Protoporphyrin Inhibition of Fetal and Neonatal Brain Heme Oxygenase - Trans-Placental Passage of the Metalloporphyrin and Prenatal Suppression of Hyperbilirubinemia in the Newborn Animal. *Journal of Clinical Investigation*. 1986 Mar;77(3):971-6.

Dubocovich ML. Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988 Sep;246(3):902-10.

Dvorin JD, Martyn DC, Patel SD, Grimley JS, Collins CR, Hopp CS, et al. A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. *Science*. 2010 May 14;328(5980):910-2.

Eddy SR. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics*. 1998;14(9):755-63.

Egan TJ, Combrinck JM, Egan J, Hearne GR, Marques HM, Ntenti S, et al. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*. 2002 Jul 15;365(Pt 2):343-7.

Elabbadi N, Ancelin ML, Vial HJ. Characterization of phosphatidylinositol synthase and evidence of a polyphosphoinositide cycle in *Plasmodium*-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*. 1994 Feb;63(2):179-92.

Elliott DA, McIntosh MT, Hosgood HD, 3rd, Chen S, Zhang G, Baevova P, et al. Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 19;105(7):2463-8.

Engelmann FM, Rocha SV, Toma HE, Araki K, Baptista MS. Determination of n-octanol/water partition and membrane binding of cationic porphyrins. *Int J Pharm*. 2007 Feb 1;329(1-2):12-8.

Enomoto M, Kawazu S, Kawai S, Furuyama W, Ikegami T, Watanabe J, et al. Blockage of spontaneous Ca²⁺ oscillation causes cell death in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*. 2012;7(7):e39499.

Epiphanyo S, Mikolajczak SA, Goncalves LA, Pamplona A, Portugal S, Albuquerque S, et al. Heme oxygenase-1 is an anti-inflammatory host factor that promotes murine plasmodium liver infection. *Cell Host Microbe*. 2008 May 15;3(5):331-8.

Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2006 Oct;Chapter 5:Unit 5 6.

Fang J, Marchesini N, Moreno SN. A *Toxoplasma gondii* phosphoinositide phospholipase C (TgPI-PLC) with high affinity for phosphatidylinositol. *Biochem J*. 2006 Mar 1;394(Pt 2):417-25.

Farias SL, Gazarini ML, Melo RL, Hirata IY, Juliano MA, Juliano L, et al. Cysteine-protease activity elicited by Ca²⁺ stimulus in *Plasmodium*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005 May;141(1):71-9.

Fidock DA, Nomura T, Wellem TE. Cycloguanil and its parent compound proguanil demonstrate distinct activities against *Plasmodium falciparum* malaria parasites transformed with human dihydrofolate reductase. *Mol Pharmacol*. 1998 Dec;54(6):1140-7.

Fisher SK, Novak JE, Agranoff BW. Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J Neurochem*. 2002 Aug;82(4):736-54.

Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO. Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiol Rev*. 2007 Apr;87(2):593-658.

Garcia CR, Ann SE, Tavares ES, Dluzewski AR, Mason WT, Paiva FB. Acidic calcium pools in intraerythrocytic malaria parasites. *Eur J Cell Biol*. 1998 Jun;76(2):133-8.

Garcia CR, Dluzewski AR, Catalani LH, Burtling R, Hoyland J, Mason WT. Calcium homeostasis in intraerythrocytic malaria parasites. *Eur J Cell Biol*. 1996 Dec;71(4):409-13.

Garcia CRS. Calcium homeostasis and signaling in the blood-stage malaria parasite. *Parasitology Today*. 1999 Dec;15(12):488-91.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2002 Oct 3;419(6906):498-511.

Gazarini ML, Garcia CR. Interruption of the blood-stage cycle of the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi*, by protein tyrosine kinase inhibitors. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Nov;36(11):1465-9.

Gazarini ML, Sigolo CA, Markus RP, Thomas AP, Garcia CR. Antimalarial drugs disrupt ion homeostasis in malarial parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Jun;102(3):329-34.

Gazarini ML, Thomas AP, Pozzan T, Garcia CR. Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. *J Cell Biol*. 2003 Apr 14;161(1):103-10.

Gerold P, Dieckmann-Schuppert A, Schwarz RT. Glycosylphosphatidylinositols synthesized by asexual erythrocytic stages of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. Candidates for plasmodial glycosylphosphatidylinositol membrane anchor precursors and pathogenicity factors. *J Biol Chem*. 1994 Jan 28;269(4):2597-606.

Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106 Suppl 1:85-90.

Goldberg DP. Corrolazines: new frontiers in high-valent metalloporphyrinoid stability and reactivity. *Acc Chem Res*. 2007 Jul;40(7):626-34.

Goldie P, Roth EF, Jr., Oppenheim J, Vanderberg JP. Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* hemozoin. *Am J Trop Med Hyg*. 1990 Dec;43(6):584-96.

Gorka AP, Alumasa JN, Sherlach KS, Jacobs LM, Nickley KB, Brower JP, et al. Cytostatic versus cytotoxic activities of chloroquine analogues and inhibition of hemozoin crystal growth. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):356-64.

- Grabowsky M. The billion-dollar malaria moment. *Nature*. 2008 Feb 28;451(7182):1051-2.
- Graca-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GR, Paes MC, Sorgine MH, et al. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol*. 2006 Apr;36(4):322-35.
- Grasso R, Franco Raffo H. Cytochemical and morphological studies in erythroblasts of human placenta. *Arch Histol Norm Patol*. 1965 Jun 1;9(1):104-12.
- Guinovart C, Navia MM, Tanner M, Alonso PL. Malaria: burden of disease. *Current Molecular Medicine*. 2006 Mar;6(2):137-40.
- Haldar K, Henderson CL, Cross GA. Identification of the parasite transferrin receptor of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and its acylation via 1,2-diacyl-sn-glycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Nov;83(22):8565-9.
- Hawking F. The clock of the malaria parasite. *Sci Am*. 1970 Jun;222(6):123-31.
- Hermosura MC, Takeuchi H, Fleig A, Riley AM, Potter BV, Hirata M, et al. InsP4 facilitates store-operated calcium influx by inhibition of InsP3 5-phosphatase. *Nature*. 2000 Dec 7;408(6813):735-40.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:425-79.
- Heslop JP, Irvine RF, Tashjian AH, Berridge MJ. Inositol tetrakisphosphate and pentakisphosphate in Gh4 cells. *Journal of Experimental Biology*. 1985 Nov;119:395-401.
- Hirata M, Watanabe Y, Ishimatsu T, Yanaga F, Koga T, Ozaki S. Inositol 1,4,5-trisphosphate affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Apr 16;168(1):379-86.
- Hirata M, Watanabe Y, Yoshida M, Koga T, Ozaki S. Roles for Hydroxyl-Groups of D-Myo-Inositol 1,4,5-Trisphosphate in the Recognition by Its Receptor and Metabolic Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. 1993 Sep 15;268(26):19260-6.
- Hokin MR, Hokin LE. Enzyme secretion and the incorporation of P-82 into phospholipides of pancreas slices. *Journal of Biological Chemistry*. 1953;203(2):967-77.
- Holder AA, Lockyer MJ, Odink KG, Sandhu JS, Riveros-Moreno V, Nicholls SC, et al. Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Nature*. 1985 Sep 19-25;317(6034):270-3.
- Hotta CT, Gazarini ML, Beraldo FH, Varotti FP, Lopes C, Markus RP, et al. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol*. 2000 Jul;2(7):466-8.
- Huang G, Bartlett PJ, Thomas AP, Moreno SN, Docampo R. Acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei* have an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor that is required for growth and infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 29;110(5):1887-92.

Hughes AR, Putney JW. Inositol phosphate formation and its relationship to calcium signaling. *Environmental Health Perspectives*. 1990 Mar;84:141-7.

Irvine RF, Anggard EE, Letcher AJ, Downes CP. Metabolism of Inositol 1,4,5-Trisphosphate and Inositol 1,3,4-Trisphosphate in Rat Parotid-Glands. *Biochemical Journal*. 1985;229(2):505-11.

Irvine RF, Letcher AJ, Heslop JP, Berridge MJ. The inositol tris/tetrakisphosphate pathway--demonstration of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase activity in animal tissues. *Nature*. 1986 Apr 17-23;320(6063):631-4.

Irvine RF, McNulty TJ, Schell MJ. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate as a second messenger--a special role in neurones? *Chem Phys Lipids*. 1999 Apr;98(1-2):49-57.

Irvine RF. Inositide evolution - towards turtle domination? *Journal of Physiology-London*. 2005 Jul 15;566(2):295-300.

Jani D, Nagarkatti R, Beatty W, Angel R, Slebodnick C, Andersen J, et al. HDP-a novel heme detoxification protein from the malaria parasite. *PLoS Pathog*. 2008 Apr;4(4):e1000053.

Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrang P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol*. 2008 Jul;154(6):1182-95.

Joseph SK, Brownell S, Khan MT. Calcium regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*. 2005 Dec;38(6):539-46.

Kappe SHI, Vaughan AM, Boddey JA, Cowman AF. That Was Then But This Is Now: Malaria Research in the Time of an Eradication Agenda. *Science*. 2010 May 14;328(5980):862-6.

Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec 9;338(1):558-67.

Kinobe RT, Dercho RA, Nakatsu K. Inhibitors of the heme oxygenase - carbon monoxide system: on the doorstep of the clinic? *Can J Physiol Pharmacol*. 2008 Sep;86(9):577-99.

Kishigami A, Ogasawara T, Watanabe Y, Hirata M, Maeda T, Hayashi F, et al. Inositol-1,4,5-trisphosphate-binding proteins controlling the phototransduction cascade of invertebrate visual cells. *J Exp Biol*. 2001 Feb;204(Pt 3):487-93.

Koga Y, Morii H. Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007 Mar;71(1):97-120.

Koyama FC, Chakrabarti D, Garcia CR. Molecular machinery of signal transduction and cell cycle regulation in Plasmodium. *Mol Biochem Parasitol*. 2009 May;165(1):1-7.

Krinke O, Novotna Z, Valentova O, Martinec J. Inositol trisphosphate receptor in higher plants: is it real? *J Exp Bot*. 2007;58(3):361-76.

Krotoski WA. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985;79(1):1-11.

- Kumar S, Guha M, Choubey V, Maity P, Bandyopadhyay U. Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (beta-hematin) formation: a mechanistic update. *Life Sci.* 2007 Feb 6;80(9):813-28.
- Kumar S, Guha M, Choubey V, Maity P, Srivastava K, Puri SK, et al. Bilirubin inhibits *Plasmodium falciparum* growth through the generation of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2008 Feb 15;44(4):602-13.
- Kutty RK, Daniel RF, Ryan DE, Levin W, Maines MD. Rat liver cytochrome P-450b, P-420b, and P-420c are degraded to biliverdin by heme oxygenase. *Arch Biochem Biophys.* 1988 Feb 1;260(2):638-44.
- Labbe RF, Vreman HJ, Stevenson DK. Zinc protoporphyrin: A metabolite with a mission. *Clinical Chemistry.* 1999 Dec;45(12):2060-72.
- Lai FP, Mody SM, Yung LY, Kam JY, Pang CS, Pang SF, et al. Molecular determinants for the differential coupling of Galpha(16) to the melatonin MT1, MT2 and *Xenopus* Mel1c receptors. *J Neurochem.* 2002 Mar;80(5):736-45.
- Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol.* 1979 Jun;65(3):418-20.
- Langreth SG. Feeding mechanisms in extracellular *Babesia microti* and *Plasmodium lophurae*. *J Protozool.* 1976 May;23(2):215-23.
- Leeper FJ. The Biosynthesis of Porphyrins, Chlorophylls, and Vitamin-B12. *Natural Product Reports.* 1989 Apr;6(2):171-203.
- Lew VL, Tiffert T. Is invasion efficiency in malaria controlled by pre-invasion events? *Trends in Parasitology.* 2007 Oct;23(10):481-4.
- Leykauf K, Treeck M, Gilson PR, Nebl T, Bräulke T, Cowman AF, et al. Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite. *PLoS Pathog.* 2010;6(6):e1000941.
- Li WH, Schultz C, Llopis J, Tsien RY. Membrane-permeant esters of inositol polyphosphates, chemical syntheses and biological applications. *Tetrahedron.* 1997 Sep 1;53(35):12017-40.
- Lima WR, Moraes M, Alves E, Azevedo MF, Passos DO, Garcia CR. The P_{hNF}-YB transcription factor is a downstream target of melatonin and cAMP signalling in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Pineal Res.* 2013 Mar;54(2):145-53.
- Lin WH, Ye R, Ma H, Xu ZH, Xue HW. DNA chip-based expression profile analysis indicates involvement of the phosphatidylinositol signaling pathway in multiple plant responses to hormone and abiotic treatments. *Cell Research.* 2004 Feb;14(1):34-45.
- Mackrill JJ. Ryanodine receptor calcium release channels: an evolutionary perspective. *Adv Exp Med Biol.* 2012;740:159-82.

Madeira L, Galante PA, Budu A, Azevedo MF, Malnic B, Garcia CR. Genome-wide detection of serpentine receptor-like proteins in malaria parasites. *PLoS One*. 2008;3(3):e1889.

Maines MD, Kappas A. Regulation of heme pathway enzymes and cellular glutathione content by metals that do not chelate with tetrapyrroles: blockade of metal effects by thiols. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 May;74(5):1875-8.

Maines MD. Bile pigments: newcomers to the cell signaling arena. *Toxicol Sci*. 2003 Jan;71(1):9-10.

Maldonado J, Marina C, Puig J, Maizo Z, Avilan L. A study of cutaneous lesions caused by *Leishmania mexicana* in plasminogen-deficient mice. *Exp Mol Pathol*. 2006 Jun;80(3):289-94.

Martin SK, Jett M, Schneider I. Correlation of phosphoinositide hydrolysis with exflagellation in the malaria microgametocyte. *J Parasitol*. 1994 Jun;80(3):371-8.

Martiney JA, Cerami A, Slater AF. Inhibition of hemozoin formation in *Plasmodium falciparum* trophozoite extracts by heme analogs: possible implication in the resistance to malaria conferred by the beta-thalassemia trait. *Mol Med*. 1996 Mar;2(2):236-46.

Matsu-ura T, Michikawa T, Inoue T, Miyawaki A, Yoshida M, Mikoshiba K. Cytosolic inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells. *J Cell Biol*. 2006 Jun 5;173(5):755-65.

McCoubrey WK, Jr., Huang TJ, Maines MD. Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J Biol Chem*. 1997 May 9;272(19):12568-74.

Meimoun P, Vidal G, Bohrer AS, Lehner A, Tran D, Briand J, et al. Intracellular Ca²⁺ stores could participate to abscisic acid-induced depolarization and stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav*. 2009 Sep;4(9):830-5.

Menger FM, Sykes BM. Anatomy of a coacervate. *Langmuir*. 1998 Jul 21;14(15):4131-7.

Merckx A, Nivez MP, Bouyer G, Alano P, Langsley G, Deitsch K, et al. *Plasmodium falciparum* regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance. *PLoS Pathog*. 2008 Feb 8;4(2):e19.

Michell RH. Inositol derivatives: evolution and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Feb;9(2):151-61.

Michell RH. Inositol phospholipids and cell-surface receptor function. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1975;415(1):81-147.

Mikoshiba K. IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem*. 2007 Sep;102(5):1426-46.

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002 Feb 7;415(6872):673-9.

- Monteiro D, Liu Q, Lisboa S, Scherer GE, Quader H, Malho R. Phosphoinositides and phosphatidic acid regulate pollen tube growth and reorientation through modulation of $[Ca^{2+}]_c$ and membrane secretion. *J Exp Bot*. 2005 Jun;56(416):1665-74.
- Monti D, Vodopivec B, Basilico N, Olliaro P, Taramelli D. A novel endogenous antimalarial: Fe(II)-protoporphyrin IX alpha (heme) inhibits hematin polymerization to beta-hematin (malaria pigment) and kills malaria parasites. *Biochemistry*. 1999 Jul 13;38(28):8858-63.
- Moore LR, Fujioka H, Williams PS, Chalmers JJ, Grimberg B, Zimmerman PA, et al. Hemoglobin degradation in malaria-infected erythrocytes determined from live cell magnetophoresis. *FASEB J*. 2006 Apr;20(6):747-9.
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JCR, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science*. 2001 Jan 5;291(5501):141-4.
- Mullins UL, Fernandes PB, Eison AS. Melatonin agonists induce phosphoinositide hydrolysis in *Xenopus laevis* melanophores. *Cell Signal*. 1997 Feb;9(2):169-73.
- Nagamune K, Sibley LD. Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa. *Mol Biol Evol*. 2006 Aug;23(8):1613-27.
- Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 1994 Jun 17;269(24):16712-9.
- O'Donnell AJ, Schneider P, McWatters HG, Reece SE. Fitness costs of disrupting circadian rhythms in malaria parasites. *Proc Biol Sci*. 2011 Aug 22;278(1717):2429-36.
- Okada K. The novel heme oxygenase-like protein from Plasmodium falciparum converts heme to bilirubin IXalpha in the apicoplast. *FEBS Lett*. 2009 Jan 22;583(2):313-9.
- Olszewski KL, Morrisey JM, Wilinski D, Burns JM, Vaidya AB, Rabinowitz JD, et al. Host-parasite interactions revealed by Plasmodium falciparum metabolomics. *Cell Host Microbe*. 2009 Feb 19;5(2):191-9.
- Pagola S, Stephens PW, Bohle DS, Kosar AD, Madsen SK. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature*. 2000 Mar 16;404(6775):307-10.
- Pancholi V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2001 Jun;58(7):902-20.
- Pandey AV, Babbarwal VK, Okoyeh JN, Joshi RM, Puri SK, Singh RL, et al. Hemozoin formation in malaria: a two-step process involving histidine-rich proteins and lipids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Sep 5;308(4):736-43.

- Papalexis V, Siomos MA, Campanale N, Guo X, Kocak G, Foley M, et al. Histidine-rich protein 2 of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is involved in detoxification of the by-products of haemoglobin degradation. *Mol Biochem Parasitol*. 2001 Jun;115(1):77-86.
- Passos AP, Garcia CR. Inositol 1,4,5-trisphosphate induced Ca²⁺ release from chloroquine-sensitive and -insensitive intracellular stores in the intraerythrocytic stage of the malaria parasite *P. chabaudi*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Apr 7;245(1):155-60.
- Patel S, Joseph SK, Thomas AP. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*. 1999 Mar;25(3):247-64.
- Pattni K, Banting G. Ins(1,4,5)P₃ metabolism and the family of IP₃-3Kinases. *Cell Signal*. 2004 Jun;16(6):643-54.
- Phelan D, Winter GM, Rogers WJ, Lam JC, Denison MS. Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Sep 1;357(1):155-63.
- Prole DL, Taylor CW. Identification of intracellular and plasma membrane calcium channel homologues in pathogenic parasites. *PLoS One*. 2011;6(10):e26218.
- Quinones W, Pena P, Domingo-Sananes M, Caceres A, Michels PA, Avilan L, et al. *Leishmania mexicana*: molecular cloning and characterization of enolase. *Exp Parasitol*. 2007 Jul;116(3):241-51.
- Raabe AC, Wengelnik K, Billker O, Vial HJ. Multiple roles for *Plasmodium berghei* phosphoinositide-specific phospholipase C in regulating gametocyte activation and differentiation. *Cell Microbiol*. 2011 Jul;13(7):955-66.
- Rainbow RD, Macmillan D, McCarron JG. The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ store arrangement in vascular smooth muscle. *Cell Calcium*. 2009 Nov-Dec;46(5-6):313-22.
- Rathore D, McCutchan TF, Sullivan M, Kumar S. Antimalarial drugs: current status and new developments. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005 Jul;14(7):871-83.
- Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*. 1991 May;12(2):151-80.
- Rhie G, Beale SI. Biosynthesis of phycobilins. Ferredoxin-supported nadph-independent heme oxygenase and phycobillin-forming activities from *Cyanidium caldarium*. *J Biol Chem*. 1992 Aug 15;267(23):16088-93.
- Rich SM, Leendertz FH, Xu G, LeBreton M, Djoko CF, Aminake MN, et al. The origin of malignant malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Sep 1;106(35):14902-7.
- Riglar DT, Rogers KL, Hanssen E, Turnbull L, Bullen HE, Charnaud SC, et al. Spatial association with PTEX complexes defines regions for effector export into *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Nat Commun*. 2013;4:1415.

Rohrbach P, Friedrich O, Hentschel J, Plattner H, Fink RH, Lanzer M. Quantitative calcium measurements in subcellular compartments of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Biol Chem*. 2005 Jul 29;280(30):27960-9.

Rowe JA, Claessens A, Corrigan RA, Arman M. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med*. 2009;11:e16.

Ruiz FA, Marchesini N, Seufferheld M, Govindjee, Docampo R. The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. *J Biol Chem*. 2001 Dec 7;276(49):46196-203.

Rupp I, Sologub L, Williamson KC, Scheuermayer M, Reininger L, Doerig C, et al. Malaria parasites form filamentous cell-to-cell connections during reproduction in the mosquito midgut. *Cell Res*. 2011 Apr;21(4):683-96.

Russell PF. *Malariology - A Comprehensive Survey of All Aspects of This Group of Diseases from a Global Standpoint*, vol 1-2. American Journal of Public Health and the Nations Health. 1950 Jun;40(6):755-6.

Sartorello R, Budu A, Bagnaresi P, Fernandes CA, Sato PM, Bueno VB, et al. In vivo uptake of a haem analogue Zn protoporphyrin IX by the human malaria parasite *P. falciparum*-infected red blood cells. *Cell Biol Int*. 2010 Aug 1;34(8):859-65.

Sato S, Clough B, Coates L, Wilson RJ. Enzymes for heme biosynthesis are found in both the mitochondrion and plastid of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Protist*. 2004 Mar;155(1):117-25.

Schacter BA, Nelson EB, Marver HS, Masters BS. Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system. *J Biol Chem*. 1972 Jun 10;247(11):3601-7.

Schmitt MP. Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*: identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. *J Bacteriol*. 1997 Feb;179(3):838-45.

Schmitt TH, Frezzatti WA, Jr., Schreier S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Nov 15;307(1):96-103.

Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med*. 1993 Jan 1;177(1):145-53.

Schofield L, Novakovic S, Gerold P, Schwarz RT, McConville MJ, Tachado SD. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J Immunol*. 1996 Mar 1;156(5):1886-96.

Schuck DC, Ribeiro RY, Nery AA, Ulrich H, Garcia CR. Flow cytometry as a tool for analyzing changes in *Plasmodium falciparum* cell cycle following treatment with indol compounds. *Cytometry A*. 2011 Nov;79(11):959-64.

Sherman IW. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and reduced glutathione in malaria-infected erythrocytes (*Plasmodium lophurae* and *P. berghei*). *J Protozool*. 1965 Aug;12(3):394-6.

Sigala PA, Crowley JR, Hsieh S, Henderson JP, Goldberg DE. Direct tests of enzymatic heme degradation by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2012 Nov 2;287(45):37793-807.

Sinal CJ, Bend JR. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of *cyp1a1* by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Mol Pharmacol*. 1997 Oct;52(4):590-9.

Singh AP, Ozwara H, Kocken CH, Puri SK, Thomas AW, Chitnis CE. Targeted deletion of *Plasmodium knowlesi* Duffy binding protein confirms its role in junction formation during invasion. *Mol Microbiol*. 2005 Mar;55(6):1925-34.

Slater AF, Cerami A. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature*. 1992 Jan 9;355(6356):167-9.

Smith IF, Wiltgen SM, Parker I. Localization of puff sites adjacent to the plasma membrane: functional and spatial characterization of Ca^{2+} signaling in SH-SY5Y cells utilizing membrane-permeant caged IP₃. *Cell Calcium*. 2009 Jan;45(1):65-76.

Smith IF, Wiltgen SM, Shuai J, Parker I. Ca^{2+} puffs originate from preestablished stable clusters of inositol trisphosphate receptors. *Sci Signal*. 2009;2(98):ra77.

Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005 Mar 10;434(7030):214-7.

Steffens F, Zhou XB, Sausbier U, Sailer C, Motejlek K, Ruth P, et al. Melatonin receptor signaling in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes as probed by large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel activity. *Mol Endocrinol*. 2003 Oct;17(10):2103-15.

Stojiljkovic I, Kumar V, Srinivasan N. Non-iron metalloporphyrins: potent antibacterial compounds that exploit haem/Hb uptake systems of pathogenic bacteria. *Mol Microbiol*. 1999 Jan;31(2):429-42.

Stork CJ, Li YV. Zinc release from thapsigargin/IP₃-sensitive stores in cultured cortical neurons. *J Mol Signal*. 2010;5:5.

Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*. 1983 Nov 3-9;306(5938):67-9.

Struck NS, Dias SD, Langer C, Marti M, Pearce JA, Cowman AF, et al. Re-defining the Golgi complex in *Plasmodium falciparum* using the novel Golgi marker PfGRASP. *Journal of Cell Science*. 2005 Dec 1;118(23):5603-13.

Sullivan DJ. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int J Parasitol.* 2002 Dec 4;32(13):1645-53.

Surolia N, Padmanaban G. de novo biosynthesis of heme offers a new chemotherapeutic target in the human malarial parasite. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Sep 16;187(2):744-50.

Tachado SD, Gerold P, McConville MJ, Baldwin T, Quilici D, Schwarz RT, et al. Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Immunol.* 1996 Mar 1;156(5):1897-907.

Taliaferro WIH, Taliaferro JG. Superinfection and protective experiments with Plasmodium brasilianum in monkeys. *American Journal of Hygiene.* 1934 Jul;20(1):60-72.

Taylor CW, Genazzani AA, Morris SA. Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell Calcium.* 1999 Dec;26(6):237-51.

Taylor CW, Laude AJ. IP₃ receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium.* 2002 Nov-Dec;32(5-6):321-34.

Terry MJ, Linley PJ, Kohchi T. Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. *Biochem Soc Trans.* 2002 Aug;30(4):604-9.

Thomas AP, Alexander J, Williamson JR. Relationship between Inositol Polyphosphate Production and the Increase of Cytosolic Free Ca²⁺ Induced by Vasopressin in Isolated Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry.* 1984;259(9):5574-84.

Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res.* 2005 Sep;39(2):99-104.

Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 1976 Aug 20;193(4254):673-5.

Tsim ST, Wong JT, Wong YH. Calcium ion dependency and the role of inositol phosphates in melatonin-induced encystment of dinoflagellates. *J Cell Sci.* 1997 Jun;110 (Pt 12):1387-93.

Uchiyama T, Yoshikawa F, Hishida A, Furuichi T, Mikoshiba K. A novel recombinant hyperaffinity inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) absorbent traps IP₃, resulting in specific inhibition of IP₃-mediated calcium signaling. *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;277(10):8106-13.

Usui-Aoki K, Matsumoto K, Koganezawa M, Kohatsu S, Isono K, Matsubayashi H, et al. Targeted expression of Ip₃ sponge and Ip₃ dsRNA impairs sugar taste sensation in *Drosophila*. *J Neurogenet.* 2005 Jul-Dec;19(3-4):123-41.

Vaid A, Ranjan R, Smythe WA, Hoppe HC, Sharma P. PfPI3K, a phosphatidylinositol-3 kinase from Plasmodium falciparum, is exported to the host erythrocyte and is involved in hemoglobin trafficking. *Blood.* 2010 Mar 25;115(12):2500-7.

Vaid A, Sharma P. PfPKB, a protein kinase B-like enzyme from *Plasmodium falciparum*: II. Identification of calcium/calmodulin as its upstream activator and dissection of a novel signaling pathway. *J Biol Chem*. 2006 Sep 15;281(37):27126-33.

Vaid A, Thomas DC, Sharma P. Role of Ca²⁺/calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2008 Feb 29;283(9):5589-97.

van Deenen LL, de Gier J, Demel RA, de Kruyff B, Blok MC, van der Neut-Kok EC, et al. Lipid-lipid and lipid-protein interaction in model systems and membranes. *Ann N Y Acad Sci*. 1975 Dec 30;264:124-41.

Van der Zee J, Barr DP, Mason RP. ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-Butyl hydroperoxide. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(2):199-206.

Van Petegem F. Ryanodine receptors: structure and function. *J Biol Chem*. 2012 Sep 14;287(38):31624-32.

Vanecek J. Cellular mechanism of melatonin action in neonatal rat pituitary. *Neuroendocrinology*. 1995 Jan;61(1):27-30.

Varotti FP, Beraldo FH, Gazarini ML, Garcia CR. *Plasmodium falciparum* malaria parasites display a THG-sensitive Ca²⁺ pool. *Cell Calcium*. 2003 Feb;33(2):137-44.

Vial HJ, Ancelin ML, Philippot JR, Thuet MJ. Biosynthesis and dynamics of lipids in *Plasmodium*-infected mature mammalian erythrocytes. *Blood Cells*. 1990;16(2-3):531-55; discussion 56-61.

Violin JD, Zhang J, Tsien RY, Newton AC. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *J Cell Biol*. 2003 Jun 9;161(5):899-909.

Vreman HJ, Cipkala DA, Stevenson DK. Characterization of porphyrin heme oxygenase inhibitors. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1996 Mar;74(3):278-85.

Wang J, de Montellano PR. The binding sites on human heme oxygenase-1 for cytochrome p450 reductase and biliverdin reductase. *J Biol Chem*. 2003 May 30;278(22):20069-76.

Wengelnik K, Vial HJ. Characterisation of the phosphatidylinositol synthase gene of *Plasmodium* species. *Res Microbiol*. 2007 Jan-Feb;158(1):51-9.

Wilks A, Ortiz de Montellano PR, Sun J, Loehr TM. Heme oxygenase (HO-1): His-132 stabilizes a distal water ligand and assists catalysis. *Biochemistry*. 1996 Jan 23;35(3):930-6.

Woodcock EA, Lambert KA, Du XJ. Ins(1,4,5)P₃ during myocardial ischemia and its relationship to the development of arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol*. 1996 Oct;28(10):2129-38.

Worrall E, Basu S, Hanson K. Is malaria a disease of poverty? A review of the literature. *Tropical Medicine & International Health*. 2005 Oct;10(10):1047-59.